

Medizinische Klinik Innenstadt
Klinikum der Universität
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

**Die plasmazytoide und
die myeloide dendritische Zelle:**

**Zusammenhang von Toll-like Rezeptor-Expression
und Sensitivität gegenüber
Lipopolysaccharid und CpG-DNA**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Andreas Towarowski
aus Breslau

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. G.Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. J. Heesemann

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Chr. Klein

Prof. Dr. P. B. Becker

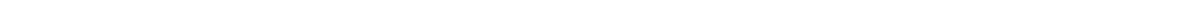
Mitbetreuung durch die

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Anne Krug

Dr. med. Simon Rothenfusser

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2006



Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit.....	1
1.2	Das humane Immunsystem und Gefahrensignale	3
1.2.1	Angeborene und erworbene Immunität	3
1.2.2	Phylogenetisch konservierte Muster charakterisieren Pathogene	4
1.2.3	Toll-like Rezeptoren (TLR)	5
1.2.4	TLR4 ist essentiell für die Erkennung von Lipopolysaccharid	6
1.2.5	TLR9 ist der Rezeptor für bakterielle und virale DNA	7
1.2.6	Signaltransduktionswege der Toll-like-Rezeptoren.....	7
1.3	CpG-Oligodesoxynukleotide	10
1.3.1	Geschichtliche Entwicklung.....	10
1.3.2	Immunstimulatorische CpG-ODN: Synthetische Imitate bakterieller DNA.....	11
1.3.3	Aktivierung des Immunsystems mit CpG-Oligodesoxynukleotiden	12
1.3.4	Unterschiedliche Klassen von CpG-Oligodesoxynukleotiden	14
1.4	Dendritische Zellen im humanen Immunsystem	15
1.4.1	Funktion der dendritischen Zellen	15
1.4.2	Subpopulationen im peripheren Blut	17
1.4.3	Die plasmazytoide dendritische Zelle	18
1.4.4	Die myeloide dendritische Zelle	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien und Geräte	21
2.1.1	Geräte	21
2.1.2	Chemikalien.....	21
2.1.3	Reagenziensätze	22
2.1.4	Materialien für die Zellkultur	22
2.1.5	Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen	23
2.1.6	Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien.....	23
2.1.7	Antikörper	25
2.1.8	Oligonukleotide	26
2.1.9	Primer für die Amplifikation der TLR-codierenden Gene	26
2.2	Zellulär – Immunologische Methoden	26
2.2.1	Zellkulturen	26
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	27
2.2.3	Bestrahlung von Stimulatorzellen.....	27
2.2.4	Kultivierung von CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten und der	

Kontrollzelllinie	27
2.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut.....	28
2.2.6 Aufreinigung von Zellen mittels magnetisch unterstützter Zellsortierung	28
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mit ELISA-Test.....	29
2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	30
2.3 Molekularbiologische Methoden	33
2.3.1 Isolation von RNA aus plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen .	33
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und CpG-ODN.....	34
2.3.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA.....	34
2.3.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)	35
2.3.5 Gelelektrophorese	36
2.3.6 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (<i>real-time PCR</i>)	36
2.4 Statistische Analyse	38
3 Ergebnisse	39
3.1 Plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen reagieren auf unterschiedliche mikrobielle Stimuli.....	39
3.1.1 Expression verschiedener TLRs in dendritischen Zellen.....	42
3.2 Charakterisierung der Effekte von CpG-Oligodesoxynukleotiden auf plasmazytoide dendritische Zellen	43
3.2.1 ODN 2006 fördert das Überleben von plasmazytoiden dendritischen Zellen, Reifung und Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression	44
3.2.2 PDC produzieren nur nach synergistischer Stimulation mit CpG und CD40 Ligand bioaktives IL-12p70.....	45
3.2.3 Das Verhältnis der produzierten Menge an IFN- α und IL-12 wird bestimmt vom Differenzierungsgrad der plasmazytoiden dendritischen Zellen.....	48
3.2.4 ODN 2006 steigert die Fähigkeit von plasmazytoiden dendritischen Zellen, Proliferation von naiven CD4 T-Zellen zu induzieren	50
3.2.5 Mit ODN 2006 und CD40 Ligand gleichzeitig stimulierte plasmazytoide dendritische Zellen induzieren IL-12-abhängig eine Th1-Antwort.....	51
3.2.6 Die Aktivierung der PDC durch ODN 2006 ist CpG-Motiv abhängig.....	53
4 Diskussion	55
4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde	55
4.2 Eigene Befunde im Vergleich mit der Literatur	56
4.2.1 Toll-like Rezeptoren auf verschiedenen dendritischen Zellen des peripheren Blutes	56
4.2.2 Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen durch CpG-Oligonukleotide.	57

4.2.3	Aktivierung myeloider dendritischer Zellen durch Lipopolysaccharid	58
4.2.4	Zytokinproduktion plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen	59
4.2.5	Gesteigerte Expression von Chemokin-Rezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulation mit ODN 2006	60
4.2.6	Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort durch plasmazytoide dendritische Zellen.....	60
4.3	Bewertung der Ergebnisse	62
4.3.1	Die Ausstattung mit Toll-like Rezeptoren bestimmt die Sensitivität plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen auf verschiedene mikrobielle Moleküle	62
4.3.2	Die plasmazytoide dendritische Zelle ist zentral für die Erkennung von CpG-ODN	63
4.3.3	Die Rolle der plasmazytoiden dendritischen Zelle bei viraler Infektion	65
4.3.4	Die unterschiedlichen CpG-Typen	66
4.3.5	PDC benötigen zur Produktion von bioaktivem IL-12 zwei Signale.....	68
4.3.6	Die T-Zell-Region im Lymphknoten als Ort der Interaktion	69
4.4	Therapeutische Relevanz der Aktivierung des Immunsystems durch CpG	69
4.4.1	CpG in der Therapie von Infektionskrankheiten und als Vakzine-Adjuvans	70
4.4.2	CpG in der Immuntherapie von Tumoren	71
4.4.3	CpG-Therapie bei Allergien.....	72
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	75
7	Abkürzungen	81
8	Danksagung	83
9	Veröffentlichungen	85
10	Lebenslauf	87

1 Einleitung

1.1 Ausgangspunkt und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe „Therapeutische Oligonukleotide“ konnte bereits mehrfach beobachtet werden, dass nicht alle Zellen des menschlichen Immunsystems in gleicher Weise auf eine Stimulation mit CpG-ODN oder LPS reagierten. CpG-ODN sind als Imitate eindringender Viren und Bakterien ein ideales Anschauungsbeispiel zur Erforschung einer erregerspezifischen Immunantwort. Zwar waren einige Effekte von CpG bekannt sowie bereits erste klinische Anwendungen theoretisch angedacht worden, ein genauer Wirkmechanismus jedoch nicht darzustellen. Die Einleitung einer Th1-Antwort mit der Stimulation von NK-Zellen und IFN- γ produzierenden T-Zellen war gesichert, genauso wie die auf diese Weise mögliche Umkehr einer überschießenden Th2-Reaktion. LPS ist als integraler Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien praktisch ubiquitär vorhanden, die genaue Rezeptorzelle war jedoch auch nicht bekannt.

Eine Aktivierung des Immunsystems durch diese beiden Substanzen war unstrittig. Vor allem von LPS war eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems bekannt – nicht zuletzt durch die ernste klinische Komplikation eines Endotoxinschocks. Zumeist jedoch waren diese Untersuchungen *in vitro* in gemischten Populationen gemacht worden und daher für eine differenzierte Interpretation ungeeignet. Welche Zelltypen für die gemessenen Effekte verantwortlich waren – oder wie viele überhaupt in der Lage wären, CpG-ODN direkt zu erkennen – und auch welche Zytokine in der Signalübertragung von Bedeutung waren, war noch immer unklar. Dies ist jedoch von vitalem Interesse, wenn man sich die Vorteile von CpG-ODN in der Therapie zunutze machen will.

Auch aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit geeigneter Isolationsmöglichkeiten, blieben erste Untersuchungen direkter und indirekter Effekte von CpG-ODN vage. Es wurde aber klar, dass Stimulation mit bestimmten CpG-Sequenzen (bestes Beispiel ist hier ODN 2216) zu einer sehr hohen IFN- α -Produktion führte. Auf Stimulation mit ODN 2006 hin ließ sich eine gesteigerte Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) auf der Oberfläche einiger Zellen beobachten. Zum Teil ließen sich die Effekte, die in gemischten Zellpopulationen auf einzelne Zellpopulationen zu sehen waren, durch Überstände von mit CpG-ODN inkubierten Zellen imitieren oder durch Zugabe einzelner Zytokine wie IFN- α .

hervorrufen⁷⁸. Dies erhärtete die Vermutung, dass vielleicht nur einzelne Zellen direkt auf CpG-ODN reagierten. Durch weitere Signalübermittlung über unterschiedliche Zytokinprofile ließen sich dann die Effekte erklären, die auf anderen Zellen zu beobachten waren. In aufwändigen Untersuchungen isolierter Zellpopulationen mit unterschiedlichen Stimuli zeigte sich, dass die meisten Zelltypen nicht in der Lage sind, direkt auf CpG-ODN zu reagieren.

Als Rezeptorzelle für Stimulation des humanen Immunsystems blieben daher theoretisch vor allem die dendritischen Zellen des peripheren Blutes, die aufgrund ihrer zentralen Lage in der Regulation der Immunantwort zur Vermittlung solch entscheidender Effekte in der Lage wären. Nach Ihrer erst kürzlich erfolgten Entdeckung und darauf folgenden exakten Beschreibung in der Literatur konzentrierte sich die Forschung auf die immunologischen Eigenschaften dieser Zellen. Mit unseren Beobachtungen zu CpG und PDC^{40, 71} war dieser Zelltyp in das Zentrum des Interesses unserer Arbeitsgruppe gerückt. In diesen beiden Arbeiten zeigte sich, dass PDC auf Stimulation mit CpG-ODN hin mit Zytokinproduktion reagieren – vor allem großer Mengen IFN- α – und auch Aktivierungsmarker auf ihrer Oberfläche exprimieren. Auf der anderen Seite drängte sich die Frage auf, ob verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut primäre Ziele unterschiedlicher bakterieller oder viraler Erreger darstellen. Von großem Interesse waren hierbei eventuell bestehende ungleiche spezifische Eigenschaften von MDC und PDC. Dies könnte durch komplementäre Rezeptorausstattung vorgegeben sein und zu entsprechend angepassten Immunreaktionen führen.

Diese Arbeit untersucht daher die Reaktion myeloider bzw. plasmazytoider dendritischer Zellen auf verschiedene mikrobielle Stimuli. Folgende Fragen werden dabei erforscht:

- Reagieren PDC und MDC unterschiedlich auf bestimmte mikrobielle Stimuli?
- Gibt es für diese Reaktionsfähigkeit eine Erklärung durch Darstellung der Ausstattung mit Toll-like-Rezeptoren auf molekularbiologischer Ebene?
- Wie unterschiedlich sind beide Zellarten hinsichtlich der Oberflächenmarker und der Zytokinproduktion?
- Wie läßt sich die durch die PDC nach Stimulation durch CpG-ODN angeregte T-Zelle charakterisieren?

1.2 Das humane Immunsystem und Gefahrensignale

Ständig ist der Mensch in seiner Umwelt der Gefahr ausgesetzt, exogen durch pathogene Erreger oder endogen durch krankhaft veränderte Körperzellen in seiner Integrität angegriffen zu werden. Das Immunsystem dient mit seinen zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen dem Zweck, diese Bedrohung zu erkennen und unschädlich zu machen. Dabei muss es körperfremde Substanzen und Erreger erkennen und bekämpfen, ohne gleichzeitig die Unversehrtheit des eigenen Körpers zu belangen.

Dass dies eine Gratwanderung ist, lässt sich an zwei Beispielen veranschaulichen. Zum einen funktioniert das Erkennen von pathologischen Zellen nicht immer so gut, wie es in etwa bei virusinfizierten Zellen der Fall ist, die darauf hin phagozytiert werden. Dies kann man leicht an der Entwicklung von großen Tumorzellmassen sehen, die oft jahrelang unbehelligt vom Immunsystem proliferieren können. Auf der anderen Seite entstehen Allergien und Autoimmunerkrankungen durch Überreaktion bzw. Fehlleistung im Tolerieren körpereigener Gewebe des Immunsystems. Daraus folgt eine unangemessene Immunantwort, die in diesem Fall mehr schadet als nützt. Die Modulation dieses Systems als therapeutische Option der modernen Medizin erfordert ein tiefgreifendes und umfassendes Verständnis der einzelnen Vorgänge.

1.2.1 Angeborene und erworbene Immunität

Zur Abwehr von Pathogenen bedient sich das Immunsystem zweier Systeme, der angeborenen (unspezifischen) und der adaptiven (spezifischen) Immunität. Das adaptive Immunsystem ist hoch entwickelt und besteht aus Antigen-spezifischen T- und B-Zellen. Durch die somatische Rekombination während der Entwicklungsphase ist eine große Vielfalt an sezernierten Immunglobulinen sowie der Antigenrezeptoren auf den T-Zellen sicher gestellt, die jeden Lymphozyten einzigartig machen. Durch die anschließende negative Selektion werden Lymphozyten, die für körpereigenes Gewebe spezifisch und damit schädlich sind, aussortiert. Auf diese Art besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass für jeden Erreger bereits der passende Antigenrezeptor auf einem Lymphozyten existiert. Trifft dieser Lymphozyt nun „sein“ Antigen, so wird er durch diesen Stimulus aktiviert und antwortet mit klonaler Proliferation und vermehrt entsprechend die Zahl und Effektivität der zu diesem Pathogen passenden Lymphozyten. Dieser Mechanismus erklärt auch, warum einige Tage notwendig sind, bis das adaptive Immunsystem in seiner

vollen Kraft Erreger bekämpfen kann. Allerdings wird dieses Abwehrsystem nicht genetisch weiter gegeben, sondern in jedem Organismus müssen von neuem genetische Sequenzen der Rezeptoren umgelagert, Lymphozyten generiert und selektiert werden.

Während das adaptive (oder erworbene) Immunsystem nur in Wirbeltieren vorhanden ist, findet sich im Gegensatz dazu das angeborene Immunsystem auch in weniger hoch entwickelten Lebewesen. Es besteht aus Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Antigenpräsentation und ist ebenso in der Lage, zwischen selbst und nicht-selbst zu unterscheiden und legt damit den Grundstein zur erfolgreichen Verteidigung des Körpers vor Eindringlingen. Überdies ist das angeborene Immunsystem ein notwendiger Faktor in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems und moduliert es auch im weiteren Verlauf. Beide Komponenten sind daher als integrierte Teile eines komplexen Systems zu sehen, in dem angeborene Immunität eine Sensor- und Aktivatorfunktion für die anschließende spezifische Immunantwort übernimmt.

1.2.2 Phylogenetisch konservierte Muster charakterisieren Pathogene

Begrenzt durch die Größe des Genoms, um die Erkennung aller potentiell inokulierbaren Erreger zu kodieren, stellt sich die Zweiteilung des Immunsystems als kluge Lösung heraus: Durch somatische Rekombination werden im Laufe eines Lebens nach derzeit herrschender Meinung $10^{14} - 10^{18}$ verschiedene T-Zell Rezeptoren und Immunglobuline generiert, die eine große Bandbreite abdecken. Auf der anderen Seite werden im angeborenen Immunsystem Informationen weitergegeben, anhand derer spezifische Strukturen auf Mikroorganismen, die im Wirtsorganismus nicht vorkommen, erkannt werden können. Zumeist handelt es sich hierbei um überlebensnotwendige Strukturen der Pathogene, die daher nicht mutieren können und außerdem in der Regel von einer großen Klasse von Erregern geteilt werden. Diese *pathogen-associated molecular patterns* (*PAMP* = Pathogen-abhängige molekulare Muster) sind vielen Erregern gemein und werden durch *pattern-recognition receptors* (*PRR* = Mustererkennungsrezeptoren) erkannt, die sich auf oder in Zellen des angeborenen Immunsystems befinden.

Zu diesen zählen insbesondere die Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen, Monozyten und verschiedene Subpopulationen dendritischer Zellen. Durch die genetische Kodierung finden sich auf allen Zellpopulationen identische PRRs, die eine spezifische Reaktion auslösen können. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort führt eine Aktivierung dieser Rezeptoren zu einer sofortigen Immunantwort, da nicht erst eine

klonale Expansion erfolgen muss. Diese Immunantworten werden von der auf den jeweiligen Erreger spezialisierten Zelle initiiert, wobei hier die dendritischen Zellen eine besondere Rolle spielen. Sie sind auf Grund ihrer Ausstattung mit Rezeptoren und ihrer Fähigkeit zur Phagozytose extrazellulärer Bestandteile und anschließender Präsentation im MHC-Kontext (MHC = *Major histocompatibility complex*) in der Lage, entsprechend ihrem Aktivierungsgrad in drainierenden Lymphknoten Toleranz oder eine spezifische Immunantwort einzuleiten.

Dies ist sinnvoll und notwendig, da die Abwehr verschiedener Erreger bereits zu sehr frühen Zeitpunkten unterschiedliche Mechanismen erfordert. So ist es im Fall eines extrazellulären Parasiten eventuell notwendig, dass Eosinophile aktiviert werden müssen und Interleukin-4 (IL-4) produziert wird. Im Gegensatz dazu wird zur Abwehr von intrazellulären viralen Erregern eine andere Art der Immunantwort benötigt, hier müssen *Natural-Killer-Cells* (NK-Zellen) aktiviert werden, um die Infektion bis zur Produktion von spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten unter Kontrolle zu halten. Nach derzeitigem Wissensstand gehören im menschlichen Körper die Lektin-Rezeptoren ¹, die Scavenger-Rezeptoren ² sowie die Toll-like-Rezeptoren ³ zu den PRRs.

1.2.3 Toll-like Rezeptoren (TLR)

Die bisher am besten charakterisierte Gruppe von Muster-Erkennungsrezeptoren ist die der Toll-like Rezeptoren. Untersuchungen an Fruchtfliegen (*Drosophila*) führten zu den ersten Einsichten in das System der Erkennung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem. *Drosophila* zeigen, obwohl sie kein adaptives Immunsystem besitzen, eine effektive Abwehr von Mikroorganismen ⁴. Hierbei konnte festgestellt werden, dass Fruchtfliegen eine für die Bekämpfung von eindringenden Mikroorganismen wichtige Familie von Rezeptoren, die so genannten Toll-Rezeptoren, besitzen. So wird die Aktivierung der antifungalen Peptide durch Toll-Rezeptoren induziert, die ursprünglich als für die dorso-ventrale Ausrichtung in der embryonalen Entwicklung verantwortlich identifiziert worden waren ⁵. Erwachsene Fruchtfliegen, deren Gene für Toll und 18-wheeler, einem später entdeckten regulatorischen Rezeptor, mutiert sind, können Infektionen durch Pilze oder Bakterien bei weitem nicht mehr so effektiv bekämpfen. Daraus kann man schließen, dass es in *Drosophila* mindestens zwei Rezeptoren aus der Toll-Familie gibt, die zwischen verschiedenen Pathogenen unterscheiden und eine passende Immunantwort initiieren können.

In Säugetieren konnten homologe Rezeptoren zu diesen Toll-Rezeptoren gefunden werden, die daraufhin *Toll-like Receptors* (TLR: Toll-ähnliche Rezeptoren) genannt wurden⁶. Inzwischen sind im humanen System zehn verschiedene TLRs beschrieben (zum Zeitpunkt des experimentellen Teils dieser Arbeit waren es noch neun), TLR11 und TLR12 gibt es nur in der Maus. Für fast alle TLRs wurden inzwischen Liganden identifiziert, von denen die meisten mikrobiellen Ursprungs sind. Es gibt jedoch auch Hinweise für endogene Liganden, die bei Zellschädigung und Zellstress freigesetzt werden könnten. Einen Überblick bietet Tabelle 1. Durch Heterodimerisierung von TLRs (z.B. TLR1 mit TLR2 und TLR2 mit TLR6) kann das Repertoire der von TLRs erkannten Strukturen nochmals erhöht werden.

TLR	PAMP	Pathogen	Referenz
TLR1	Kooperiert mit TLR2		
TLR2	Lipoproteine	Gram-positive Bakterien	⁷
	Zymosan	Hefen	⁸
	MALP-2	Mykoplasmen	⁷
	LAM	Mykobakterien	⁹
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren	¹⁰
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien	¹¹
	Protein F	RSV	¹²
	HSP 60	Wirt	¹³
	Hyaluronan	Wirt	¹⁴
	Fibronektin	Wirt	¹⁵
TLR5	Flagellin		¹⁶
TLR6	Kooperiert mit TLR2		
TLR7	Guanosin-Analoga	Nicht bekannt	¹⁷
TLR8	Guanosin-Analoga	Nicht bekannt	¹⁸
TLR9	CpG-Motive	Bakterien, Viren	⁷
TLR10	Nicht bekannt	Nicht bekannt	

Tabelle 1: Humane Toll-like Rezeptoren und Ihre Liganden

1.2.4 TLR4 ist essentiell für die Erkennung von Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien und kann bei Menschen die lebensbedrohliche Situation des Endotoxin-Schocks auslösen. LPS ist ein komplexes Glykolipid, das aus einem hydrophilen Polysaccharid und einem hydrophoben Teil, Lipid A, besteht, der für die biologische Aktivität von LPS verantwortlich ist. Nach Interaktion mit dem LPS-bindenden Protein (LBP) vermittelt LPS seine Wirkung über CD14 (CD = *cluster of differentiation*) auf Monozyten und andere myeloide Zellen. Jedoch können – bedingt durch lösliches CD14 im Serum – auch CD14⁻ Zellen wie Endothelzellen auf LPS reagieren.

In zwei Mausklonen, die eine deutlich verminderte Reaktion auf LPS zeigten, konnte eine Mutation im Gen für TLR4 nachgewiesen werden^{11, 19}. Durch Generierung von TLR4-defizienten Mäusen, die ebenfalls stark vermindert auf LPS reagierten, konnte schließlich bestätigt werden, dass TLR4 für die Signaltransduktion von LPS essentiell ist. Auch beim Menschen sind Mutationen im Gen für TLR4 mit einer verminderten Reaktion auf LPS verbunden²⁰. Überexpression von TLR4 hingegen bewirkt keine Überreagibilität auf LPS, da für die Wirkung von LPS über TLR4 ein weiteres Molekül (MD-2) notwendig ist²¹. Dieses sezernierte Molekül ist auf der Zelloberfläche an die extrazelluläre Domäne von TLR4 angelagert und wird für die Bindung von LPS an TLR4 benötigt.

1.2.5 TLR9 ist der Rezeptor für bakterielle und virale DNA

Ein erster Hinweis auf die Rolle von TLR9 als Rezeptor für mikrobielle DNA war die Arbeit von Hemmi *et al.*, in der TLR9-defiziente Mäuse keinerlei Effekte zeigten, die von CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) hervorgerufen werden⁷. CpG-ODN werden verwendet, um standardisiert die Wirkung bakterieller und viraler DNA zu imitieren. So konnten weder Proliferation von B-Zellen, noch Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch Makrophagen, noch Ausreifung von dendritischen Zellen beobachtet werden. Ebenso wie die CpG-induzierte Aktivierung von intrazellulären Entzündungsmediatoren – einschließlich NF- κ B, JNK, und IRAK – waren auch die Nebenwirkungen von CpG-ODN, wie CpG-induziertes letales Schock-Syndrom, aufgehoben. Bauer *et al.* gelang 2001 durch Transfektion muriner und humaner Zellen mit TLR9 der Nachweis, dass CpG-DNA unabhängig von CD14 und MD-2 über TLR9 erkannt wird²². Zur Erkennung von CpG-DNA muss diese in einem Endosom in die Zelle aufgenommen werden, das anschließend durch Azidifizierung zum Lysosom wird. Von diesem Lysosom aus wird anschließend durch Rekrutierung des *Myeloid Differentiation Factor 88* (MyD88) über TLR9 das Signal ausgelöst²³.

1.2.6 Signaltransduktionswege der Toll-like-Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind evolutionär hoch-konservierte Transmembranproteine, die in der Ektodomäne wiederholt Leucin-reiche Sequenzen und auf der zytoplasmatischen Seite die so genannte TIR Domäne besitzen²⁴. Dieser intrazytoplasmatische Bereich, der entscheidend für die Signalübertragung, zeigt eine starke Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1 Rezeptor, daher auch die Bezeichnung dieser Domäne als Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR). Die Signalwege, die durch die verschiedenen TLRs ausgelöst werden,

unterscheiden sich zum Teil, weisen aber auch große Übereinstimmungen auf ²⁵. Wie der IL-1 Rezeptor nutzen alle bekannten TLRs (möglicher Weise mit Ausnahme von TLR3) MyD88 als Adapterprotein, welches eine „inflammatorische Reizantwort“ über die Aktivierung von NF- κ B und der MAP-Kinasen (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, MAPK) einleitet. Durch die Rekrutierung zusätzlicher oder alternativer Adaptermoleküle bedingt können verschiedene TLRs jedoch eine unterschiedliche Genexpression im gleichen Zelltyp induzieren.

Eine LPS-abhängige Induktion von Interferon-induzierbaren Genen und die Ausreifung von dendritischen Zellen (DC) in MyD88-defizienten Mäusen – bei aufgehobener TLR-vermittelter Zytokinproduktion – weist auf das Vorhandensein eines weiteren, MyD88-unabhängigen Signaltransduktionswegs hin ^{26, 27}. Neben MyD88 sind inzwischen zwei weitere TIR-Domänen-enthaltende Adaptermoleküle, *TIR domain-containing adapter protein* (TIRAP) und *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β* (TRIF), charakterisiert ^{28, 29}. TIRAP scheint neben oder zusammen mit MyD88 für die TLR2- oder TLR4-vermittelte Induktion proinflammatorischer Zytokine via NF- κ B notwendig zu sein ³⁰. TRIF hingegen induziert MyD88-unabhängig über die Aktivierung von *IFN-regulatory factors* (IRF) 3 und 7 die Transkription von IFN Typ I ³¹. Eine wesentliche Rolle für TRIF ist bisher für die Aktivierung über TLR3 und TLR4 belegt. Neben der Verwendung verschiedener Adaptermoleküle ist die Immunantwort, die ein bestimmter TLR-Ligand induziert, geprägt von der differentiellen Expression der Rezeptoren auf unterschiedlichen Zellen des Immunsystems und dem zellulären Kompartiment, das erreicht werden muss, um ein Signal auszulösen.

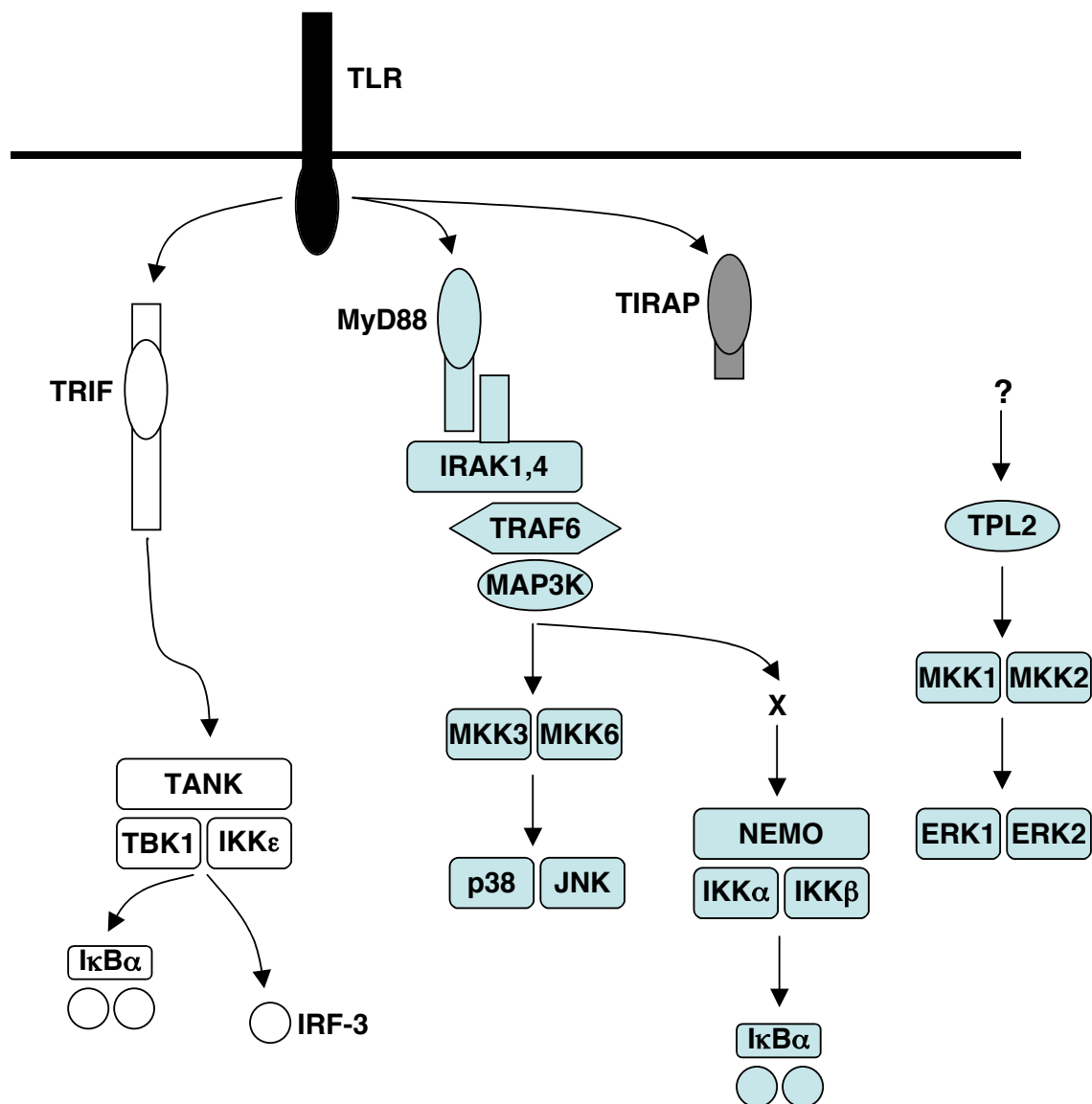


Abbildung 1: Signaltransduktion durch Toll-like-Rezeptoren (nach O'Neill, 2003)

TLRs rekrutieren die IL-1R-assoziierte Kinase 1 und 4 (IRAK 1/ 4) über das Adapterprotein MyD88, welche dann wiederum den TNFR-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) phosphorylieren und aktivieren. In Abhängigkeit von TRAF 6 kommt es schließlich über mehrere Zwischenschritte zur Aktivierung der Stresskinasen c-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38, der *extra-cellular signal-regulated kinase 1/ 2* (ERK 1/ 2) und des *inhibitor of NF- κ B α* (I κ B α)-Komplexes. Über letzteren Komplex kommt es zu einer Translokation von NF- κ B in den Nukleus und damit zu einer Transkription von NF- κ B-abhängigen Genen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), IL-1 und IL-6. MyD88-unabhängig kommt es via TRIF ebenfalls zu einer Aktivierung des I κ B α -Komplexes und zusätzlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF3.

1.3 CpG-Oligodesoxynukleotide

1.3.1 Geschichtliche Entwicklung

Der New Yorker Chirurg William Coley erkannte vor inzwischen über hundert Jahren, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumore erfolgreich zu bekämpfen. Er konnte an einem Patienten beobachten, dass sich Sarkome nach einer bakteriellen Infektion im Bereich des Tumors zurückbildeten. Daraus schließend, dass das Immunsystem durch die Infektion in die Lage versetzt wurde, den Tumor zu bekämpfen, begann er 1891 mit der gezielten lokalen Injektion von Bakterien oder bakteriellen Lysaten aus Streptokokken und Serratien. Bei einem Teil der Patienten kam es daraufhin zu einer vorübergehenden Rückbildung der Sarkome ^{32, 33}. Man kann dieses Vorgehen als erste Immuntherapie einer Tumorerkrankung bezeichnen.

Andere konnten seinerzeit seine Therapieerfolge nicht bestätigen, da zum einen um die Jahrhundertwende die Standardisierbarkeit von bakteriellen Lysaten noch nicht gegeben war und zum anderen waren die einzelnen Komponenten des Immunsystems noch nicht genügend identifiziert worden waren, um die Wirkungsweise bakterieller Lysate zu verstehen. Erst 1984 untersuchte Tokunaga die therapeutische Wirkung der verschiedenen Fraktionen des Mykobakteriums *Bacille Calmette Guerin*, indem er das bakterielle Lysat auftrennte und in Tiermodellen von Tumorerkrankungen die Effekte studierte. Als überraschendes Ergebnis stellte er fest, dass die DNA-haltige (DNA = *Desoxyribonucleic Acid*) Fraktion die höchste therapeutische Aktivität zeigte ³⁴. 1992 zeigte dann die Gruppe um Yamamoto, dass bakterielle DNA, nicht jedoch DNA von Wirbeltieren oder Pflanzen immunstimulatorische Kapazität besitzt. Er zeigte in seinen Versuchen, die er an Mäusen durchführte, dass durch die Stimulation mit DNA von Bakterien die Aktivität von NK-Zellen stieg und Zytokine produziert wurden, die Makrophagen aktivieren und die virale Replikation hemmen ³⁵.

Innerhalb der bakteriellen DNA konnten die aktiven Sequenzen anschließend eingegrenzt werden und sogenannte Palindromsequenzen (spiegelbildliche Sequenzen um ein zentrales Dinukleotid) als verantwortlich für die Aktivierung ausgemacht werden. Als nächster Schritt konnte mit synthetischen Oligonukleotiden, die solche Palindromsequenzen enthielten, die immunstimulatorische Wirkung genomischer DNA von Bakterien reproduziert werden. Somit war erstmals bewiesen, dass tatsächlich DNA selbst eine Aktivierung des Immunsystems hervorrufen kann ³⁶. Im Rahmen der

Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden (gezielte Hemmung der Produktion eines bestimmten Proteins durch komplementäre Bindung eines Antisense-Oligonukleotides an die mRNA des Proteins) wurden Verfahren verfügbar, die die Herstellung von Oligonukleotiden in großen Mengen möglich machten.

So beobachtete schließlich Arthur Krieg in seinen Versuchen mit Antisense-Oligonukleotiden, dass bestimmte Kontroll-Oligonukleotide, die er verwendete, murine B-Zellen sowohl in vitro als auch in vivo zur Proliferation und zur Sekretion von Immunglobulinen anregen³⁷. Bei der näheren Analyse dieses Phänomens erkannte er, dass bestimmte Sequenzen innerhalb des Oligonukleotides für diesen Effekt verantwortlich sind. Diese Sequenzen enthielten alle ein zentrales Cytosin-Guanin-Dinukleotid (CpG, p steht für die Phosphatbindung). Krieg konnte zeigen, dass ein solches CpG-Motiv mindestens sechs Basen lang sein muss (z.B. 5'....GACGTT....3') sowie, dass ein Palindrom – wie es Yamamoto beschrieben hatte – für die Aktivität nicht unbedingt erforderlich ist.

1.3.2 Immunstimulatorische CpG-ODN: Synthetische Imitate bakterieller DNA

Unterschiede in der Zusammensetzung der DNA von Wirbeltieren und Bakterien sind schon lange bekannt. So sind zum einen CG-Dinukleotide in bakterieller wie in synthetischer DNA am Cytosin meist nicht methyliert, während Wirbeltier-DNA in bis zu 80% der Fälle ein Methyl-Cytosin in CG-Dinukleotiden aufweist. Zudem treten CG-Dinukleotide in bakterieller DNA in der erwarteten Häufigkeit von 1:16 auf, wohingegen sie im Genom von Wirbeltieren statistisch unterrepräsentiert sind (1 von 60 Dinukleotiden). Das Immunsystem hat im Laufe der Evolution auf Grund dieses Unterschiedes einen Mechanismus zur Detektion von mikrobieller DNA entwickelt, der es ihm erlaubt, DNA von nicht-Vertebraten als PAMP und Gefahrensignal für das Immunsystem zu verwenden. Konsequenter Weise wird die immunstimulatorische Wirkung von CG-Dinukleotiden durch die Methylierung am Cytosin, wie sie im Genom von Vertebraten zu 80% vorhanden ist, stark vermindert (Tabelle 2). Durch kurze synthetische Oligodesoxynukleotide von ungefähr acht bis 30 Basen Länge, die unmethylierte CG-Dinukleotide enthalten, lassen sich unter Ausnutzung dieses Effekts die Wirkungen von bakterieller DNA imitieren.

Um den intrazellulären Abbau von unmodifizierten Oligonukleotiden durch Nukleasen zu verhindern, werden Antisense-Oligonukleotide chemisch modifiziert. Durch die so

genannte Phosphorothioat-Modifikation wird ein nicht an der Bindung beteiligtes Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt, so dass statt eines Diesters ein Thioat entsteht, das die Bindung resistenter gegen Nukleasen macht. Somit sind gut definierte synthetische Substanzen verfügbar, die zur *in-vivo*-Anwendung geeignet und gegenüber bakteriellen Lysaten leichter sowie standardisiert zu produzieren sind.

	CG-Dinukleotide	Methylierung am Cytidin
Wirbeltier-DNA	1 von 60 Dinukleotiden	ja
Bakterielle DNA	1 von 16 Dinukleotiden	nein
CpG-Dinukleotid	vorhanden (CpG-Motive; z.B. 5'...GACGTT...3')	nein

Tabelle 2: Unterschiede zwischen DNA und CpG-ODN

In mehreren Studien und auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das zur Stabilisierung der CpG-ODNs gegen Nukleasen verwendete Phosphorothioat-Rückgrat selbst immunstimulatorische Kapazität besitzt. In einer aktuellen Untersuchung wurde zwar eine Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung des ODNs festgestellt, aber die Hauptursachen für die CpG-unabhängige Immunstimulation waren das Phosphorothioat-Rückgrat und die Länge der Oligonukleotide. Dieser Effekt war direkt proportional zur Länge der ODN, reichte aber nicht an den von CpG-ODN heran. Methylierte CpG-ODN besaßen keine immunstimulatorische Aktivität ³⁸. Um die ohne die Thioat-Modifikation des Rückgrates drohende Degradierung durch Nukleasen zu verhindern und dabei nicht auf die hohe Spezifität von Phosphodiester-ODN verzichten zu müssen, entwickelte eine Arbeitsgruppe die sogenannten Phosphodiester-Immunomere ³⁹. Diese bestehen aus zwei Phosphodiester-ODN, die an ihren 3'-Enden miteinander verbunden sind und damit stabiler gegen Nukleasen sind als Phosphodiester (PO). Trotz des Phosphodiester-Rückgrates zeigten diese PO-Immunomere in Tumormodellen *in-vivo*-Aktivität.

1.3.3 Aktivierung des Immunsystems mit CpG-Oligodesoxynukleotiden

CpG-ODN können Zellen sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems aktivieren. Von den meisten Zellen des Immunsystems werden CpG-ODN endozytotisch aufgenommen, doch nur wenige können auf diesen Stimulus reagieren,

abhängig von der Expression von TLR9. Innerhalb dieser Zellen werden CpG-Motive als molekulares Muster für intrazelluläre Erreger (intrazelluläre Bakterien oder Viren) erkannt und führen daher zu einer Th1-Antwort (Th1 = *T helper cell type 1*). Die Wirkung auf das Immunsystem kann in zwei Stufen aufgeteilt werden: Eine frühe Aktivierung des angeborenen Immunsystems und später eine Verstärkung der adaptiven Immunantwort.

Zunächst reagieren B-Zellen und DC, indem eine Kaskade von Signalmechanismen dazu führt, dass kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche dieser Zellen exprimiert werden, apoptotischer Zelltod verhindert wird und Zytokine sowie Chemokine, die eine Th1-Antwort initiieren (wie z.B. Interleukin-12), sezerniert werden. Plasmazytoide dendritische Zellen produzieren hohe Mengen Interferon Typ I (IFN Typ I) und reifen zu potenten Antigen-präsentierenden Zellen (APC = *antigen presenting cell*)⁴⁰⁻⁴². Innerhalb der nächsten Stunden wird durch diese CpG-induzierten Typ I-Interferone eine breite Palette an sekundären Effekten hervorgerufen. Dazu gehören die Aktivierung von NK-Zellen, die lytische Aktivität entwickeln und wiederum ihrerseits IFN- γ als Th1-Zytokin sezernieren, und die verstärkte Expression von Fc-Rezeptoren auf polymorphnukleären Leukozyten, was zu einer Steigerung der Antikörper-vermittelten Zytotoxizität (ADCC = *antibody dependent cytotoxicity*) führt. Nach Stimulation mit CpG-ODN können primäre zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) durch die Präsentation des Antigens in einem durch die CpG-Stimulation hervorgerufenen Th1-ähnlichen Zytokin-Milieu sogar ohne T-Zell Hilfe induziert werden.

Anschließend kommt es zu einer Stimulation des adaptiven Immunsystems, die vor allem aus einer Stimulation von B-Zellen besteht. Sie werden gegenüber Aktivierung durch ihren B-Zell-Rezeptor sensibler, wenn sie gleichzeitig über TLR9 stimuliert werden. Dadurch wird selektiv die spezifische Antikörperproduktion von B-Zellen durch CpG-ODN und Antigen synergistisch stimuliert^{4, 43}. Zudem kommt es zu einem Wechsel der Immunglobulin-Isotypen hin zu Formen, die für die Abwehr von infizierten Zellen besonders geeignet sind (in der Maus IgG_{2a}).

Durch das multimodale Eingreifen von CpG-ODN kommt es zu einer koordinierten Immunantwort, die das angeborene (dendritische Zellen, Makrophagen, NK-Zellen) sowie das erworbene Immunsystem (B-Zellen und T-Zellen) umfasst⁴⁴. Hier liegt der große Vorteil der therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten von CpG-ODN gegenüber der therapeutischen Anwendung von einzelnen Komponenten, wie zum Beispiel isolierter Zytokine. Denn durch CpG-ODN wird das Gefahrensignal einer mikrobiellen Infektion

initiiert, dadurch werden auch dendritische Zellen aktiviert und auf diese Weise das komplette Immunsystem auf natürliche Weise stimuliert ⁴⁰.

1.3.4 Unterschiedliche Klassen von CpG-Oligodesoxynukleotiden

Bei der Betrachtung der Wirksamkeit verschiedener CpG-ODN sind Unterschiede zwischen den Spezies zu beachten, die sich durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz in der extrazellulären Region der Rezeptoren erklären. So wirkt das für die Maus beschriebene wirksame CpG nur schwach immunstimulatorisch im humanen System ⁴⁵. Die durch die Entwicklung von Phosphorothioat-modifizierten Oligonukleotiden ermöglichten Untersuchungen zeigten, dass sich zwar die vom murinen respektive humanen Immunsystem erkannten CpG-Motive unterscheiden, nicht jedoch die CpG-induzierte Signaltransduktion ^{45, 46}. Obwohl CpG-ODN und Endotoxin (LPS) ähnliche Signaltransduktionswege aktivieren, lassen sich die Effekte von CpG-ODN deutlich von der Wirkung von Lipopolysaccharid abgrenzen.

Hartmann konnte bei der Untersuchung von über 250 verschiedenen Sequenzen ein hochwirksames CpG-Motiv identifizieren und daraus ein Nuklease-stabiles und ausgeprägt immunstimulatorisches Phosphorothioat-Oligonukleotid entwickeln. Es entstand der Prototyp eines ODN (ODN 2006) für das humane System, das auf direktem Weg humane B-Zellen aktiviert und zur polyklonalen Proliferation anregt ^{45, 47}.

Der zweite große Unterschied zwischen Maus und Mensch in Bezug auf CpG-DNA sind die unterschiedlichen Zielzellen in diesen beiden Systemen. Während in der Maus myeloide dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen auf Grund ihrer Rezeptorausstattung in der Lage sind, direkt auf CpG-ODN zu reagieren, stellen im humanen System – neben den B-Zellen – die plasmazytoiden dendritischen Zellen den Hauptangriffspunkt für CpG-ODN dar ⁴⁸.

Im humanen System konnten drei verschiedene Typen von CpG-ODN identifiziert werden, die sich hinsichtlich der von ihnen hervorgerufenen Effekte unterscheiden. CpG-A (z.B. ODN 2216) sind durch poly-G Schwänze mit Phosphothioatbindungen um eine zentrale palindrome Sequenz, die ein CpG-Motiv beinhaltet und ein Phosphodiesterückgrat besitzt, charakterisiert. Sie führen zu einer hohen IFN- α Produktion ⁴², aktivieren B-Zellen aber nur sehr schwach. Damit entspricht die Wirkung dieses CpG-ODNs in etwa der eines

Virus, das ebenfalls vor allem zu einer hohen IFN-Typ I Produktion führt. Daher wird ODN 2216 gemeinhin als Prototyp für die Simulation einer viralen Infektion angeführt.

CpG-B (z.B. ODN 2006), die ein Phosphorothioat-Rückgrat besitzen und keine poly-G Enden haben, führen hingegen zu einer starken Proliferation von B-Zellen und zu einer Reifung und Aktivierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen, aber nur zu einer geringen Produktion von IFN- α und schwacher Aktivierung von NK-Zellen. Da diese Effekte einer bakteriellen Infektion des humanen Organismus entsprechen, wird ODN 2006 als Prototyp für eine bakterielle Infektion angeführt. Von Klinman und seinen Mitarbeitern wurden ähnliche Typen beschrieben, wobei in deren Nomenklatur D und K Typ A bzw. Typ B ODN entsprechen ⁴⁹.

Inzwischen konnten Hartmann und seine Mitarbeiter durch Kombination struktureller Merkmale von CpG-A und CpG-B einen weiteren Typ von ODN entwickeln (CpG-C), der große Mengen an IFN-Typ I induzieren kann, gleichzeitig aber auch B-Zellen stark aktiviert ⁵⁰. Die wesentlichen Charakteristika der drei CpG-Klassen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

	CpG-A	CpG-B	CpG-C
Primäre Zielzelle(n)	PDC	PDC und B-Zelle	PDC und B-Zelle
Prototyp	ODN 2216	ODN 2006	ODN M362
Strukturelle Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Poly-G-Enden - Zentrales Palindrom mit CpG-Motiv - Chimäres Rückgrat - Ausbildung partikulärer Quartärstrukturen 	<ul style="list-style-type: none"> - Optimales „humanes CpG-Motiv“ - Phosphorothioat-Rückgrat - Keine Ausbildung von Quartärstrukturen 	<ul style="list-style-type: none"> - Optimales „humanes CpG-Motiv“ und zentrales Palindrom - Phosphorothioat-Rückgrat - Evtl. Ausbildung von Quartärstrukturen
Funktionelle Charakteristika	<ul style="list-style-type: none"> - Induziert große Mengen an IFN-Typ I in PDC - Keine oder geringe Aktivierung von B-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> - Induziert sehr geringe Mengen an IFN-Typ I in PDC, aber starke Expression von kostimulatorischen Molekülen - Starke Aktivierung von B-Zellen 	<ul style="list-style-type: none"> - Induziert mittlere Mengen an IFN-Typ I in PDC - Starke Aktivierung von B-Zellen

Tabelle 3: Charakteristika der humanen CpG-Klassen

1.4 Dendritische Zellen im humanen Immunsystem

1.4.1 Funktion der dendritischen Zellen

In den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts wurden dendritische Zellen erstmals entdeckt und ihre Funktion beschrieben ⁵¹. Sie zeichnen sich durch einzigartige

Eigenschaften aus, die es ihnen ermöglichen, eine effektive und spezifische Immunantwort gegen eindringende Pathogene einzuleiten. Da DC in fast allen peripheren Geweben des Körpers vorliegen, haben sie die Möglichkeit in einer Art „Wächterfunktion“ laufend ihre Umgebung zu analysieren, indem sie extrazelluläre Bestandteile durch Phagozytose und Endozytose aufnehmen, diese prozessieren und als Peptide auf ihrer Oberfläche im MHC-Kontext präsentieren. Hierbei spielt es keine Rolle, ob es sich um kleine Proteine oder ganze Bakterien handelt. Für $\alpha\beta$ T-Zellen werden so durch DC prozessierte und im MHC-Kontext präsentierte antigene Bestandteile erst erkennbar.

Nach Kontakt mit einem Gefahrensignal verlassen DC das von ihnen überwachte Gewebe und wandern in den nächsten drainierenden Lymphknoten aus, in dem sie in T-Zell-Arealen mit T-Zellen in Kontakt treten. Dort können sie – abhängig von ihrem Aktivierungsgrad – entweder Toleranz oder eine spezifische Immunantwort gegenüber dem präsentierten Antigen induzieren. Nur im Falle, dass T-Zellen, die ihr passendes Antigen prozessiert im MHC-Kontext von einer DC präsentiert bekommen, auch eine Kostimulation durch Oberflächenmoleküle der DC erhalten, wird eine Immunantwort ausgelöst. Diese Notwendigkeit wird als Zwei-Signal-Hypothese bezeichnet.

Es hat sich gezeigt, dass das zweite Signal – adäquate Kostimulation – die Induktion einer effektiven T-Zell vermittelten Immunantwort maßgeblich beeinflusst und selbst vom Reifegrad der DC und somit von der Aktivierung der präsentierenden DC durch PAMPs abhängt. DC aktivieren über kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche Rezeptoren auf den T-Zellen im Lymphknoten, während sie ihnen das Antigen präsentieren. Falls dieses zweite Signal schwach oder nicht vorhanden ist, da das spezifische Antigen von einer unreifen DC präsentiert wird, kommt es zur Toleranz oder Anergie gegenüber diesem Antigen⁵².

Auf der anderen Seite wird ihnen durch T-Helferzellen im aktiven Zentrum des Lymphknotens ebenso ein Aktivator zur Verfügung gestellt. Durch Rückkoppelung mittels CD40-Ligation durch T-Helferzellen erhalten DC selbst weitere Stimulation und können eine passende und schlagkräftige Antwort des Immunsystems einleiten. Durch die Notwendigkeit beider Signale ist die Unterscheidung zwischen Toleranz gegenüber einem Antigen oder Aktivierung des Immunsystems gegeben.

Da die DC auf Grund ihrer kostimulatorischen Fähigkeiten über das Ausmaß der Aktivierung der T-Zellen entscheiden, rückte ihre Beobachtung in den Mittelpunkt der Erforschung des adaptiven Immunsystems. Erst in den letzten Jahren zeigte sich, dass

effektive Aktivierung und Ausreifung von DC mit anschließender Induktion einer Immunantwort vor allem durch eine Stimulation mit mikrobiellen Bestandteilen erreicht werden kann⁵³. Allerdings können DC auch durch endogene Gefahrensignale zur Ausreifung gebracht werden, so aktivieren nekrotische Zellen im Gegensatz zu apoptotischen Zellen DC, obwohl in beiden Fällen antigene Bestandteile prozessiert und T-Zellen präsentiert werden⁵⁴.

Der Erkennungsprozess von möglichen Gefahrensignalen wird durch PRRs erreicht⁵⁵. DC sind nach Erkennung mikrobieller Stimuli nicht nur in der Lage, eine adaptive Immunantwort zu initiieren, sondern können durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen weitere Immunzellen zum Ort der Infektion locken und Effektorzellen der angeborenen Immunität aktivieren⁵⁶.

1.4.2 Subpopulationen im peripheren Blut

DC stellen keine homogene Population dar, sondern unterscheiden sich in Ursprung und Stadien der Differenzierung und besitzen unterschiedliche spezifische Funktionen und migratorische Profile. Da ein objektives morphologisches Kriterium, das eine eindeutige Klassifikation einer Zelle als DC erlaubt, bisher nicht verfügbar ist, können lediglich oben beschriebene funktionelle Charakteristika heran gezogen werden. Im humanen System lassen sich zumindest phänotypisch zwei verschiedene DC-Subpopulationen des peripheren Blutes unterscheiden – die CD11c⁺ myeloide dendritische Zelle (MDC) und die CD11c⁻ plasmazytoide dendritische Zelle (PDC)⁵⁷. PDC gehen in Kultur sehr schnell in Apoptose und verdanken ihren Namen ihrem ausgeprägten endoplasmatischen Retikulum, das morphologisch an Plasmazellen erinnert. Beide stellen jeweils etwa 0,3% der mononukleären Zellen des peripheren Blutes dar und differenzieren *in vitro* in potente Antigen-präsentierende Zellen.

Eine erste genauere Charakterisierung dieser zwei unterschiedlichen Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker gelang 1999 durch die Arbeitsgruppe um Robinson⁵⁸. Die Expression lymphoider Marker in PDC, jedoch nicht in MDC, sowie die Notwendigkeit unterschiedlicher Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren für ihre Entwicklung lässt vermuten, dass DC entweder von lymphoiden oder myeloiden Vorstufen abstammen⁵⁹. Weiterhin hat sich gezeigt, dass diese zwei DC-Populationen unterschiedliche Profile an PRRs exprimieren, was die Annahme nahelegt, dass sich diese DC im Laufe der Evolution spezialisiert haben, verschiedene Pathogene zu erkennen⁶⁰.

1.4.3 Die plasmazytoide dendritische Zelle

1.4.3.1 Die Entdeckung der T-assoziierten Plasmazellen

Mittelgroße Zellen mit plasmazellähnlicher Morphologie wurden zum ersten Mal 1958 von Lennert und Remmele beschrieben⁶¹ und als „T-assoziierte Plasmazellen“ bezeichnet. Ebenso konnten viele Pathologen in T-Zell-Arealen des aktivierten Lymphknotens Plasmazellen beobachten, die den T-Zell Marker CD4 exprimierten und keine Immunglobuline im Inneren aufwiesen^{61, 62}. Man glaubte daher, dass diese Zellen terminal ausdifferenzierte T-Zellen seien, die eine unbekannte Sekretionsfunktion hätten, da sie ein reichlich vorhandenes endoplasmatisches Retikulum aufwiesen.

Ein Vierteljahrhundert nach Erstbeschreibung führte eine Veröffentlichung von Feller *et al.* zu einer Umbenennung der „T-assoziierten Plasmazellen“ in "plasmazytoide T-Zellen" (PTZ). Die Autoren konnten CD4 auf der Oberfläche dieser Zellen nachweisen, ein bekannter Marker für T-Helfer Zellen. Aus dem Fehlen von B-Zell-Antigenen und Immunglobulinen auf diesen Zellen folgerten die Autoren, dass es sich bei der PTZ um das Pendant zu der klassischen B-Plasmazelle handele, deren Aufgabe es sei, statt Immunglobulinen T-Zell-Lymphokine zu produzieren⁶³. Facchetti schlug schließlich 1988 vor, diese Zellen „plasmazytoide Monozyten“ zu nennen, da er fand, dass sie myelomonozytäre Marker auf ihrer Oberfläche trugen. Sie wiesen kein CD3 und keine T-Zell Rezeptoren auf, dafür exprimierten sie die MHC Klasse II Antigene HLA-DR und HLA-DQ (HLA = *human leukocyte antigen*)^{64, 65}.

1997 konnten Liu und Mitarbeiter zeigen, dass der plasmazytoide Monozyt identisch ist mit der schon 1994 beschriebenen *lineage*-negativen, CD4-positiven und CD11c-negativen Vorläufer-DC des peripheren Blutes. Aus dem „plasmazytoiden Monozyt“ wurde somit die „plasmazytoide dendritische Zelle“. Diese Beobachtung wurde durch eine weitere Arbeitsgruppe bestätigt, die fanden, dass PDC aus dem peripheren Blut den plasmazytoiden Zellen des lymphatischen Gewebes nicht nur in der Expression von Oberflächenantigenen, sondern auch in der Morphologie entsprachen. Schließlich gelang es, eine Reihe von Oberflächenantigenen zu entdecken, die selektiv auf dendritischen Zellen des peripheren Blutes exprimiert werden⁶⁶.

1.4.3.2 Die natürliche Typ I Interferon-produzierende Zelle

Die meisten umhüllten Viren stimulieren die Produktion von IFN Typ I (= IFN- α und IFN- β) in PBMC (*Peripheral blood mononuclear cells*), das die virale Replikation hemmt. Lange

wurde angenommen, dass die meisten humanen Blutzelltypen dazu fähig seien, doch Ende der siebziger Jahre zeigte sich, dass es einen Hauptzelltyp geben muss, der IFN Typ I produziert ⁶⁷. Diese sogenannten NIPC (*Natural interferon producing cells* = natürliche Interferon-produzierende Zellen) waren negativ für Oberflächenmarker und Eigenschaften der klassischen hämatopoetischen Stammreihen (T-, B-, NK-Zellen, Monozyten und Makrophagen), jedoch positiv für CD4 und MHC-II und stellten im Blut eine seltene Subpopulation dar.

1996 konnten Svensson und seine Mitarbeiter den Phänotyp von NIPC näher beschreiben ⁶⁸. Ihrer Meinung nach entsprachen die von ihnen als IPC (*Interferon producing cell* = Interferon-produzierende Zelle) bezeichneten Zellen den 1994 von O`Doherty entdeckten CD11c⁻ unreifen dendritischen Zellen. Siegal *et al.* bestätigten, dass NIPC in der Population der CD123⁺ Zellen von plasmazytoider Morphologie enthalten sind ⁶⁹ und damit Vorläufer-DC entsprechen. Nahezu zeitgleich konnten Cella *et al.* belegen, dass es die von ihnen plasmazytoide Monozyten genannten Zellen waren, die nach Stimulation mit CD40 Ligand oder dem Influenzavirus sehr große Mengen von IFN Typ I produzierten ⁷⁰. Damit war bewiesen, dass plasmazytoide dendritische Zellen den natürlichen Interferon-produzierenden Zellen entsprechen.

2001 konnte dann erstmals nachgewiesen werden, dass PDC nicht nur auf virale Reizung hin, sondern auch auf Stimulation mit CpG-ODN mit hoher Produktion von IFN Typ I reagierten ⁷¹. Durch die Entdeckung der optimalen Sequenz zur Stimulation von IFN-Typ I Sekretion war aufgezeigt, dass durch geeignete CpG-ODN die Mustererkennungs-Rezeptoren auf PDC stimuliert werden konnten.

1.4.3.3 Die plasmazytoide dendritische Zelle als DC2

Die Fähigkeit von ausgereiften plasmazytoiden dendritischen Zellen, naive allogene Lymphozyten zu aktivieren, wurde von Rissoan *et al.* charakterisiert ⁷². In seiner Arbeit fand er, dass von Monozyten abgeleitete dendritische Zellen eine Th1-Antwort hervorriefen, die durch hohe Mengen an IFN- γ gekennzeichnet war. Im Gegensatz dazu wurde von dendritischen Zellen, die durch Kultur mit IL-3 und CD40 Ligand aus PDC gewonnen worden waren, eine Th2-Antwort initiiert. Rissoan und seine Mitarbeiter postulierten daher, dass durch die Art der dendritischen Zellen die Polarisierung der Immunantwort bereits festgelegt wäre und nannten Subpopulationen dendritischer Zellen, je nach ihrer Fähigkeit, Th1- oder Th2-Antworten hervorzurufen, DC1 bzw. DC2.

Jedoch konnten zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass die aus PDC ausgereiften dendritischen Zellen allogene naive T-Zellen jeweils auch in die Th1-Richtung polarisieren können^{73, 74}. Zum einen scheint also das Verhältnis zwischen Stimulator- und Responder-Zellen entscheidenden Einfluß zu haben, zum anderen die Dauer der Vorinkubation. Obwohl häufig verwendet, erwies sich im Nachhinein betrachtet die Einteilung der dendritischen Zellen in DC1 und DC2 als nicht sinnvoll.

1.4.4 Die myeloide dendritische Zelle

Als gewebständige Zellen finden sich DC myeloiden Ursprungs neben den bereits erwähnten CD11c⁺ Vorläuferzellen des peripheren Blutes in praktisch allen menschlichen Organen, jedoch entstammen die meisten Einblicke in die Biologie dieser Zellen nicht aus der Isolation dieser Zellen aus Gewebe, sondern aus *in vitro*-Kultur Studien. Sie lassen sich aus CD34⁺ Stammzellen, CD14⁺ Monozyten oder aus CD11c⁺ Vorläuferzellen des peripheren Blutes^{75, 76} durch Kultur mit Zusatz von verschiedenen Zytokinen differenzieren und generieren. Während diese DC in ihrem unreifen Stadium äußerst effizient in der Aufnahme und Prozessierung von Antigenen sind, können sie durch Zugabe eines geeigneten Ausreifestimulus in die Lage versetzt werden, große Mengen an IL-12 zu produzieren, welches schließlich naive CD4⁺ T-Zellen in IFN- γ -produzierende Th1-Zellen polarisiert⁷⁷. Die relativ einfache und schnelle Generierung dieser DC in großen Mengen *in vitro* macht MDC zu einer interessanten therapeutischen Option als „natürliches Adjuvans“.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
ELISA Reader	Fa. Dynatech (Guernsey, GB)
FACSCalibur	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
Gene Quant RNA / DNA Calculator	Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D)
Lamin Air (HB 244 8)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Light Cycler	Fa. Roche (Mannheim, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop (Axiovert 25)	Fa. Zeiss (Jena, D)
MiniMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Omnifuge 2 ORS	Fa. Heraeus (Hanau, D)
pH-Meter	Fa. WTW (Weilheim, D)
Thermocycler Modell T3	Fa. Biometra (Göttingen, D)
Thermocycler RoboCycler Gradient 40	Fa. Stratagene (Heidelberg, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage (LP 6209)	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Wasser-Deionisierungsmaschine	Fa. SG Reinstwasser-Syst. (Hamburg, D)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (München, D)
Zentrifuge (5417R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2 Chemikalien

Brefeldin A [1 μ g/ml]	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
5-[und -6-]-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE) [1 μ M]	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
EDTA-Lösung 0,02%	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
FACSFlow	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)
FACSSafe	Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D)

Geneticin g-418 Sulfat	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Ratiopharm (Ulm, D)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
To-Pro-3 Iodid [2 nM]	Fa. Molecular Probes (Leiden, NL)
Trypan-Blau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

In eckigen Klammern sind die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen angegeben.

2.1.3 Reagenziensätze

CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) MicroBead Kit bzw. zurzeit der Durchführung der Experimente: BDCA-4 Dendritic Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD1c (BDCA-1) ⁺ Dendritic Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
CD45RO Microbeads	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
First-Strand-cDNA Synthesis Kit	Fa. Roche (Mannheim, D)
Fix & Perm Kit	Fa. An der Grub (Kaumberg, A)
High Pure RNA Isolation Kit	Fa. Roche (Mannheim, D)
IFN- α ELISA	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick NJ, USA)
IL-4 ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IL-12 p40 + p70 ELISA	Fa. BenderMedSystems (Wien, A)
IL-12 p70 ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
IFN- γ ELISA Kit	Fa. OptEIA PharMingen (San Diego, USA)
LightCycler FastStart DNA Sybr Green I	Fa. Roche (Mannheim, D)
LightCycler-Primer Set CCR-7	Fa. Search-LC (Heidelberg, D)
LightCycler-Primer Set Human IP-10	Fa. Search-LC (Heidelberg, D)
LightCycler-Primer Sets Housekeeping Genes	Fa. Search-LC (Heidelberg, D)
Monocyte Isolation Kit	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Taq Polymerase AmpliTaq	Fa. Perkin Elmer (Rodgau, D)

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

Biocoll Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (DMEM)	Fa. PAA (Linz, A)
Fötales Kälberserum	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)

Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)

	Fa. PAA (Linz, A)
Humanes AB-Serum	Fa. BioWhittaker (Wakersville MD, USA)
Humanes Serum Albumin (HSA)	Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning NY, USA) bezogen.

2.1.5 Zytokine, Wachstumsstimulatoren und Stimulanzen

Calcium-Ionomycin [500 ng/ml]	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> [800 U/ml]	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interferon- α [5000 U/ml]	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick NJ, USA)
Interferon- β [500 U/ml]	Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick NJ, USA)
Interleukin-2 [50 U/ml]	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Interleukin-3 [10 ng/ml]	Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D)
Lipopolysaccharid [1 μ g/ml] (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i>)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat [50 ng/ml]	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

In eckigen Klammern sind die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen angegeben.

2.1.6 Häufig verwendete Puffer, Lösungen und Medien

IMDM-Vollmedium:	IMDM-Medium (incl. Hepes)
	8 vol % humanes Serum-Albumin
	100 IU/ml Penicillin
	100 μ g/ml Streptomycin
	2 mM Glutamin

Kryo-Medium: 50 vol % IMDM-Vollmedium bzw. DMEM-Selektionsmedium
40 vol % humanes AB-Serum bzw. FCS
10 vol % DMSO

DMEM-Selektionsmedium: DMEM-Medium

5 vol % fötales Kälberserum
100 IU/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 mM Glutamin
200 µg/ml Geneticin g 418 Sulfat

MACS-Puffer: PBS
0,5 vol % humanes Serum-Albumin
2 mM EDTA
pH 7,2

TE-Puffer: Deionisiertes Wasser
100 mM Tris-Chlorid
1 mM EDTA
pH 8,0

Lyse-/Bindepuffer: Deionisiertes Wasser
4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
30 vol % Triton X-100
pH 6,6

DNase Inkubationspuffer: Deionisiertes Wasser
1 M NaCl
20 mM Tris-HCl
10 mM MnCl₂
pH 7,0

Waschpuffer 1: Deionisiertes Wasser
5 M Guanidiniumchlorid
20 mM Tris-HCl

60 vol % Ethanol

pH 6,6

Waschpuffer 2:

Deionisiertes Wasser

20 mM Na Cl

2 mM Tris-HCl

80 vol % Ethanol

pH 7,5

Elutionspuffer:

Nukleasefreies steriles Wasser

TBE-Puffer:

Deionisiertes Wasser

89 mM Tris-Borat

2 mM EDTA

pH 8,3

Wasser: Es wurde stets deionisiertes Wasser aus der Hausleitung verwendet.

2.1.7 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Name	Spezifität	Klon	Isotyp	Fluoreszenz*	Konzentration**	Herkunft
Anti-CD3	CD3	SK7	Maus IgG ₁	FITC		BD PharMingen
Anti-CD45Ra	CD45Ra	L48	Maus IgG ₁	FITC		BD PharMingen
Anti-HLA-DR	HLA-DR	L243	Maus IgG _{2a}	PerCP		BD PharMingen
Anti-IFN- γ	IFN- γ	4SB3	Maus IgG ₁	PE		BD PharMingen
Anti-Interleukin 4	Interleukin 4	8D4-8	Maus IgG ₁	PE		BD PharMingen
Anti-BDCA-2	BDCA-2	AC144	Maus IgG ₁	PE		Miltenyi Biotec
Anti-CD154	CD154 (CD40L)	TRAP1	Maus IgG ₁	FITC		BD PharMingen
Anti-CD40	CD40	FC3	Maus IgG ₁	FITC		BD PharMingen
Anti-CD80	CD80	BB1	Maus IgM	FITC		BD PharMingen
Anti-CD86	CD86	2331	Maus IgG ₁	APC		BD PharMingen
Anti-CCR7	CCR7	3D12	Ratte IgG _{2a}	Primärantikörper		R. Förster
Anti-rat IgG _{2a}	Ratte IgG _{2a}	RG7/1.30	Maus	biotinyliert		BD PharMingen
Streptavidin-APC	Biotin	-	-	APC		BD PharMingen
Anti-IFN- α	IFN- α	Poly	Hase		5000 NU/ml	PBL
Anti-IFN- β	IFN- β	Poly	Hase		2000 NU/ml	PBL
Anti-IFN Typ I Rezeptor	IFN-Rezeptor	Poly	Maus		20 μ g/ml	PBL
Anti-Interleukin 12	IL12 p40+p70	C8.6	Maus IgG ₁		3 μ g/ml	BD PharMingen

*nur bei FACS-Antikörpern; zur Färbung mit FACS-Antikörpern wurden 5 μ l pro Probenröhrchen (nach Resuspension der abzentrifugierten Zellen im rücklaufenden Tropfen) verwendet

**in den Experimenten verwendete Konzentration der nicht zur FACS-Färbung verwendeten Antikörper angegeben

2.1.8 Oligonukleotide

Alle folgenden Oligonukleotide, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden freundlicher Weise von der Fa. Coley Pharmaceutical Group (Wellesley MA, USA) zur Verfügung gestellt. Alle Oligonukleotide waren negativ für Endotoxin getestet (unter 0,03 EU/ml, LAL-Assay, Fa. BioWhittaker [Wakersville MD, USA]) und wurden, falls nicht ausdrücklich etwas anderes angemerkt ist, in einer Konzentration von 6 µg/ml eingesetzt. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide, S steht für Thioat-Rückgrat, O für Diester-Rückgrat des Oligodesoxynukleotids:

Name	Länge	Sequenz	Rückgrat	Kommentar
2006	24-mer	5'- tcg tcg ttt tgt cgt ttt gtc gtt -3'	S	CpG Typ B
2078	20-mer	5'-tgc tgc ttc ccc ccc ccc cc-3'	O	O-Kontroll ODN zu 2137
2080	20-mer	5'- tcg tcg ttc ccc ccc ccc cc-3'	O	O-Kontroll ODN zu 2006
2137	24-mer	5'-tgc tgc ttt tgt gct ttt gtg ctt-3'	S	GC-Kontroll ODN zu 2006
2216	19-mer	5'-ggg gga cga tcg tcg ggg g-3'	SOS	CpG Typ A

2.1.9 Primer für die Amplifikation der TLR-codierenden Gene

Folgende Primer wurden für den PCR-Nachweis der TLR-Expression verwendet:

	5'	3'
TLR1	CACTGAGAGTCTGCACATTGT	GTGTCTCCAACCTCAGTAAGGT
TLR2	TTTATCGTCTTCCTGCTTCAAGCC	TCTCGCAGTTCCAAACATTCCAC
TLR3	GCAAACACAAGCATTTCGGAATCT	TTGAAGGCTTGGGACCAAGGCA
TLR4	TTTCTGCAATGGATCAAGGACCA	GGACACCACAACAATCACCTTTC
TLR5	CAGTGACCAAAACAGATTCAACC	AAGAAACCAGCCAACATCCTG
TLR6	TCACCAGAGGTCCAACCTTAC	CAAGTTGTTGCAAAGCTTCCAG
TLR7	TCTACCTGGGCCAAAACCTGTT	GGCACATGCTGAAGAGAGTTA
TLR8	CCGACTTGGAAGTTCTAGATC	AATGCTTCATTTGGGATGTGCT
TLR9	CTTCCTCTACAAATGCATCACT	GTGACAGATCCAAGGTGAAGT

2.2 Zellulär – Immunologische Methoden

2.2.1 Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und 95% Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5% CO₂ in der Atmosphäre gelagert. Als

Kulturmedium wurde immer, wenn nicht explizit etwas anderes angemerkt ist, Vollmedium verwendet.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Hierbei färben sich tote Zellen im Gegensatz zu lebenden blau, da sie den Farbstoff auf Grund ihrer nicht mehr intakten Zellmembran in das Zellinnere eindringen lassen. Die Zellzahl wurde nach geeigneter Verdünnung der Zellsuspension in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt.

2.2.3 Bestrahlung von Stimulatorzellen

Um zu verhindern, dass sich Stimulatorzellen (CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten) im Versuchsansatz in Kultur teilen, vermehren und dadurch Medium verbrauchen, wurden diese in 5-10 ml Medium suspendiert und in einer Röntgenbestrahlungsanlage (Institut für Immunologie, LMU München, D) mit 30 Gray bestrahlt.

2.2.4 Kultivierung von CD40 Ligand-transfizierten Fibroblasten und der Kontrollzelllinie

CD40 Ligand-transfizierte Fibroblasten sowie untransformierte Fibroblasten der Kontrollzelllinie (beide BHK: *baby hamster kidney* = Säuglingshamsternieren) wurden in 550 ml Kulturflaschen in DMEM-Selektionsmedium kultiviert. Aufgrund adhärenenten Wachstums erfolgte die Inkubation in liegenden Kulturflaschen. Alle zwei bis drei Tage wurden vier Fünftel des Mediums erneuert, um die Konzentration des selektierenden Antibiotikums (Geneticin g418 Sulfat) über der Hemmschwelle zu halten. Entsprechend ihrem Wachstum wurden die Zellen alle fünf bis sieben Tage im Verhältnis 1:3 verdünnt und neu ausgesät. Zum Abernten dieser Zellen wurde das Medium abpipettiert und der Zellrasen für fünf Minuten mit 0,02%iger EDTA-Lösung bedeckt. Dadurch wurden die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Das EDTA wurde vor erneuter Kultur herausgewaschen. Die Zellen wurden vor dem Einsatz in Versuchen (in einer Konzentration von 50 000 Zellen/ml) gewaschen und in Vollmedium überführt.

2.2.5 Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut

Zur Isolation peripherer Blutlymphozyten wurde, je nachdem, ob Buffy Coats oder frisches Spenderblut von gesunden Probanden aus der Kollegenschaft im Labor verwendet wurden, ein jeweils angepasstes Verfahren verwendet, jedoch immer über eine Ficollpräparation aufgetrennt. Ficoll bzw. Biocoll besitzt aufgrund seiner spezifischen Dichte von 1.077 g/ml die Eigenschaft, in einer Dichte-Zentrifugation mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) an der Phasengrenze zwischen Blutserum und Biocoll anzureichern. Wegen ihrer höheren Dichte sedimentieren Erythrozyten und Granulozyten in bzw. unter die Biocollschicht. Thrombozyten hingegen finden sich wegen ihrer geringeren Dichte in der Serumschicht oberhalb des Biocolls.

Buffy Coats sind bei der Zentrifugation von Blutspenden entstehende Abfallprodukte, in denen Leukozyten angereichert sind und der Anteil an Erythrozyten deutlich geringer ist als im Vollblut. Bei Isolation von PBMCs aus Buffy Coats wurde das Blut mit einer Perfusorspritze steril aus dem Plastikbeutel entnommen, im Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt und in einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen über 15 ml Biocoll aufgeschichtet, so dass zwei Phasen entstanden. Bei Verwendung von frischem Spenderblut wurde ebenfalls im gleichen Verhältnis mit PBS verdünnt, allerdings wurden zur Separation Leucosep-Röhrchen verwendet, in die ebenfalls zuvor 15 ml Biocoll bei Raumtemperatur mittels Zentrifugation unter die Separationsmembran eingebracht worden war.

Anschließend wurde in beiden Fällen 30 min bei 1000 g ohne Abbremsen zentrifugiert und danach die Zellen in der Interphase vorsichtig – in möglichst kleinem Volumen, um so wenig Biocoll wie möglich mit aufzunehmen – mit einer Pipette aspiriert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation 10 min bei 300 g und 4 °C), bevor sie in 5 ml Ortholyse-Reagenz aufgenommen wurden, in dem sie 5 min inkubiert wurden. Nach der so erfolgten Lyse der verbliebenen Erythrozyten wurden die Zellen noch einmal gewaschen, durch Filtern mit einem 40 µm Nylonfilter von Zellklumpen befreit und schließlich die Zellzahl bestimmt.

2.2.6 Aufreinigung von Zellen mittels magnetisch unterstützter Zellsortierung

Das Prinzip der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)-Isolationsmethode ist die Markierung von Zellen mit speziellen Antikörpern, die an paramagnetische Mikropartikel

von ca. 50 nm Durchmesser gekoppelt sind. Nach Markierung der Zellen mit Microbeads in einem speziellen MACS-Puffer bei 8-12 °C für 15 min werden sie gewaschen und anschließend in MACS-Puffer resuspendiert. Danach wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält und sich im Magnetfeld eines starken Permanentmagneten befindet. Beim Durchfließen werden somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird.

Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Durch erneutes Applizieren der eluierten Zellsuspension auf eine neue Trennsäule lässt sich die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation erhöhen. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion kann anschließend in Kultur genommen werden. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden. Ebenso lassen sich verschiedene Aufreinigungs-Kits miteinander kombinieren, um vorher definierte Untergruppen von Zellpopulationen zu erhalten.

In dieser Arbeit wurden zur Aufreinigung von Zellpopulationen nach der MACS-Methode ausschließlich Reagenziensätze der Firma Miltenyi Biotec entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die mit dieser Technik erhaltenen Zellpopulationen besaßen stets eine Reinheit von über 95%.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen mit ELISA-Test

Konzentrationsbestimmung von Interferon- α und Interleukin-12 p40+p70

Zur Konzentrationsbestimmung von IFN- α und IL-12 p40+p70 wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits mit bereits vorbeschichteten ELISA-Platten nach Anleitung des Herstellers verwendet. Das Testprinzip ist, dass die im abgenommenen Überstand der Zellkultur gelösten Zytokine an die spezifischen Antikörper binden, mit denen der Boden der Vertiefungen der ELISA-Platte beschichtet ist. In einem zweiten Schritt bindet dann ein zweiter Antikörper, der Biotin gekoppelt ist, an ein anderes Epitop des Zytokins. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten werden die Vertiefungen immer mehrmals mit einem Waschpuffer gespült. Im dritten Schritt wird dann mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase

inkubiert, wobei die Streptavidin-Moleküle eine feste Bindung mit den Biotin-Molekülen eingehen. Die Meerrettichperoxidase katalysiert eine quantifizierbare, der Menge an in der Probe vorhandenem Zytokin entsprechende Reaktion, mit einem anschließend zugegebenen Farbstoff. Nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure wird die Messung der durch den umgesetzten Farbstoff hervorgerufenen Lichtabsorption direkt im Anschluss in einem ELISA-Reader bei der in der Anleitung empfohlenen Wellenlänge vorgenommen. Die Auswertung erfolgt durch den Vergleich mit einer in Doppelwerten angefertigten Standardkurve.

Konzentrationsbestimmung von Interleukin-4, Interleukin-12 p70 und Interferon- γ

Zur Konzentrationsbestimmung von IL-12 p70, IL-4 und IFN- γ wurden ELISA-Kits zum Selbstbeschichten nach Anleitung des Herstellers verwendet. Das Testprinzip beruht darauf, dass die Wände der Vertiefungen von 96-Well Maxisorbplatten über Nacht mit Antikörpern gegen das zu messende Zytokin beschichtet werden. Zur Verhinderung von unspezifischen Bindungen wird die Platte am nächsten Tag mit einem Blockierungsreagenz (fötales Kälberserum) geblockt, bevor dann die Proben und die Standardkurve in die Vertiefungen pipettiert werden. Im Unterschied zu den fertigen ELISAs werden bei den Kits zum Selbstbeschichten die Biotin-konjugierten Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin zeitgleich mit dem Streptavidin in die Platte pipettiert. Die Zugabe des Farbstoffes und die Auswertung am ELISA-Reader erfolgt auf die gleiche Art.

2.2.8 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Allgemeines Funktionsprinzip

Die FACS-Analyse (*Fluorescence-activated cell sorting*) stellt eine Möglichkeit dar, Größe, Granularität und Oberflächenantigene von Zellen darzustellen und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen das zu messende Oberflächenantigen markiert und in einem Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch eine Messkammer geführt. Hier wird der Zellstrom in der Trägerflüssigkeit auf das Küvettenzentrum verengt und beschleunigt, so dass die Zellen einzeln in ausreichendem Abstand voneinander am Messpunkt vorbeifließen. Am Messpunkt führen Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre Granula zu einer Lichtstreuung des einfallenden Laserstrahls, die durch je

einen Photodetektor in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einen im rechten Winkel dazu liegenden (Seitwärtsstreulicht) registriert und in elektrische Signale umgewandelt wird.

Die Intensität des Vorwärtsstreulichts wird im Wesentlichen durch die Zellgröße, die des Seitwärtsstreulichts durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Der Laserstrahl regt weiterhin das Chromophor der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper zur Emission von Lichtquanten an, die ebenfalls in Linsen gesammelt werden. Dabei trennen Filter das gesammelte Licht und lenken es nach Wellenlängenbereichen aufgetrennt zu verschiedenen Photodetektoren. So können Signale verschiedener Wellenlänge voneinander getrennt aufgenommen und analysiert werden (Mehrfarbenanalyse). Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten gelingt jedoch nicht vollständig, da sich die Spektren der einzelnen Chromophore teilweise überlappen. Dies wird durch Kompensation korrigiert, indem der durch Überlappung entstehende Anteil von den registrierten Fluoreszenzsignalen abgezogen wird. Durch Negativkontrolle mittels Färbung mit Isotyp-Antikörpern, die es erlauben, das Hineinstrahlen von der Wellenlänge her benachbarter Farbstoffe in einen bestimmten Kanal zu erkennen, kann so die Signalverstärkung einzelner Kanäle justiert werden. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Zahl der pro Zelle gebundenen Antikörper gegen das untersuchte Oberflächenantigen.

Hier eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die entsprechenden maximalen Exzitations- und Emissions-Wellenlängen:

Fluoreszenzfarbstoff	Exzitation	Emission
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	494 nm	518 nm
Phycoerythrin (PE)	565 nm	575 nm
Allophycocyanin (APC)	650 nm	660 nm
To-Pro-3 Iodid	642 nm	661 nm
Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)	488 nm	675 nm

FACS-Analyse

Für FACS-Analysen wurden 2×10^4 bis 2×10^5 Zellen in FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Zellen im rücklaufenden Tropfen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen im Dunkeln bei 4 °C mit FITC (Fluoreszeinisothiocyanat),

PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin-Chlorophyll-Protein) oder APC (Allophycocyanin) gekoppelten Antikörpern für 15-30 min inkubiert. Diese fluoreszierenden Farbstoffe strahlen in der angegebenen Reihenfolge in die Kanäle 1-4, die mit dem verwendeten FACSCalibur analysiert werden konnten. Bei manchen Färbungen (indirekte Immunfluoreszenz) wurde zuerst mit einem unmarkierten Antikörper gegen ein Antigen inkubiert, der in einem zweiten Arbeitsschritt durch einen Farbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper, der gegen den ersten Antikörper bindet, im FACS darstellbar gemacht wurde. In Sonderfällen war erst der für den Sekundärantikörper spezifische Tertiärantikörper mit einem Chromophor beladen.

Bei intrazellulären Färbungen wurden wie oben beschrieben zuerst die Oberflächenantigene angefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen allerdings mit dem Fix & Perm-Kit nach Anleitung des Herstellers fixiert und permeabilisiert und damit eine Anfärbung von intrazellulären Zellbestandteilen ermöglicht. Zunächst wurden die Zellen 15 min bei Raumtemperatur fixiert und nach einmaligen Waschen mit PBS dann 15 min permeabilisiert. Gleichzeitig mit dem Permeabilisationsreagenz wurden die Antikörper gegen die intrazellulären Moleküle dazu pipettiert. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen danach direkt auf einem Durchflusszytometer Modell FACSCalibur mit der CellQuest-Software analysiert.

Bestimmung der spezifischen Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe der FACS-Analyse

Zum Nachweis der Proliferation von naiven CD4⁺ T-Zellen wurden diese nach der Isolation mit CFSE (5-[und -6]-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester) markiert. Nach der im Ergebnisteil jeweils angegebenen Zeit wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. CFSE ist ein Molekül, das unspezifisch an alle Proteine bindet und bei Zellteilungen gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben wird. Aufgrund seiner Eigenschaft, sich bei Zellteilungen gleichmäßig auf Tochterzellen zu verteilen, kann angenommen werden, dass Zellen, die bei der Analyse die stärkste Fluoreszenzintensität aufweisen, ungeteilt sind, während Zellen, die eine jeweils halb so starke Fluoreszenz aufweisen, mindestens eine Zellteilung hinter sich haben. Aus der Anzahl der Zellen in einer Fluoreszenzspitze kann damit rückgeschlossen werden, wie viele Zellen sich wie oft geteilt haben.

Zur homogenen CFSE-Färbung einer bestimmten Zellpopulation wurde folgendes Protokoll verwendet: 10 Mio Zellen wurden in 0,4 ml PBS mit CFSE (Konzentration $1\mu\text{M}$) gefärbt, anschließend vorsichtig durchmischt, dann in ein neues Gefäß überführt (um möglicherweise am Rand anhaftende ungefärbte Zellen auszuschließen) und für 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 2 ml IMDM-Vollmedium gestoppt und die Zellen zwei Mal mit PSB gewaschen.

Bestimmung des Überlebens von dendritischen Zellen mit FACS-Analyse

Zum Nachweis des Überlebens dendritischer Zellen wurden tote Zellen kurz vor der FACS-Analyse mit To-Pro-3 angefärbt. To-Pro-3 ist ein Farbstoff, der freie DNA-Stücke anfärbt. Da bei vitalen Zellen die Zellwand intakt ist, und daher kein Farbstoff an die DNA gelangen kann, färben sich nur tote Zellen an, bei denen die Zellwand durchlässig für den Farbstoff geworden ist. Die Zahl von viablen Zellen wurde nach Zugabe einer definierten Menge von *calibration beads* im FACS gemessen und ist in den Diagrammen als relative Zahl der To-Pro-3 negativen Zellen pro 100 beads dargestellt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolation von RNA aus plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen

Zur Isolation von RNA (*ribonucleic acid*) aus plasmazytoiden und myeloiden dendritischen Zellen wurde der *High Pure RNA Isolation Kit* von Roche nach Anleitung des Herstellers verwendet. Dazu wurden zunächst ca. 10^6 der aufgereinigten Zellen, die nach oben beschriebenen Prinzipien aus PBMCs gewonnen worden waren, in $200\mu\text{l}$ PBS resuspendiert. Nach Zugabe von $400\mu\text{l}$ Lyse-/Bindepuffer, der innerhalb weniger Sekunden die Zellen lysiert und gleichzeitig die RNAsen inaktiviert, wurde die Probe in einem zweiteiligen Auffanggefäß 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Die RNA adsorbierte dabei an das Glasfaservlies des Filters im oberen Reservoir, während die anderen Zellbestandteile in das untere Reservoir durchliefen und anschließend verworfen wurden. Da am Glasfaservlies alle Nukleinsäuren spezifisch binden, mußte die Probe danach mittels einer enzymatischen Verdauungsreaktion von kontaminierender DNA befreit werden, was durch Inkubation mit $100\mu\text{l}$ DNase I für 15 min bei $15\text{--}25^\circ\text{C}$ geschah. Nach drei darauf folgenden Waschschritten (1. Zugabe von $500\mu\text{l}$ Waschpuffer 1, Zentrifugation

15 s bei 8000 g; 2. Zugabe von 500 μ l Waschpuffer 2, Zentrifugation 15 s bei 8000 g; 3. Zugabe von 200 μ l Waschpuffer 2, Zentrifugation 2 min bei 13 000 g) konnte die RNA mit 50 μ l Elutionspuffer aus dem Filter gewaschen werden (Zentrifugation 1 min bei 8000 g). Die extrahierte RNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA, RNA und CpG-ODN

Die Konzentration von RNA, DNA und CpG-ODN wurde mithilfe eines Spektrometers bestimmt. Dazu wurde zumeist ein komplettes Absorptionsspektrum von 220 bis 320 nm der Nukleinsäure-Lösung in Wasser aufgenommen und bei 260 nm Wellenlänge (Absorptionsmaximum) die optische Dichte bestimmt. Der OD_{260} von 1 entsprechen dann etwa 50 μ g/ml DNA, 40 μ g/ml RNA, oder 20 μ g/ml CpG-ODN.

2.3.3 Reverse Transkription von RNA in cDNA

Um RNA mit Hilfe der PCR (*Polymerase chain reaction* = Polymerase Kettenreaktion) amplifizieren zu können, muss die RNA zunächst revers transkribiert, das heißt in einen cDNA-Einzelstrang umgeschrieben werden. Dazu wurde der *1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)* von Roche nach Anleitung des Herstellers verwendet. Der Reaktionsansatz enthält folgende Reagenzien (in Klammern die Endkonzentration): Tris (10 mM), KCl (50 mM), $MgCl_2$ (5mM), *Deoxynucleotide Mix* (1 mM), Oligo-p(dT)₁₅ Primer (0,04 A_{260} U), RNase Inhibitor (50 U) und AMV Reverse Transkriptase (20 U).

8,2 μ l RNA wurden zusammen mit 11,8 μ l dieses *Master Mixes* für zunächst 10 min bei 25 °C und anschließend für 60 min bei 42 °C inkubiert. In der ersten Inkubation binden dabei die Primer an die RNA-Matrize, die in der zweiten Inkubation zu cDNA transkribiert wird. Danach wurde die AMV Reverse Transkriptase durch fünfminütiges Erhitzen des Reaktionsgemischs auf 99 °C und anschließendes Abkühlen auf 4 °C denaturiert, um eine Kontamination der cDNA, die zu Beeinträchtigungen bei nachfolgenden Untersuchungen (PCR) führen könnte, zu vermeiden. Die gewonnene cDNA wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Volumen von 500 μ l gebracht, wie es für die nachfolgenden Reaktionsschritte in der Anleitung der Hersteller verlangt ist.

2.3.4 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (rt-PCR)

Durch die PCR ist es möglich, ein bestimmtes DNA-Stück aus einem Gemisch unterschiedlicher Nukleinsäuren zu vermehren. Die Reaktion erfolgt mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und eines Paares sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer, das den Enden der zu amplifizierenden DNA homolog ist. Die Reaktion besteht aus drei Schritten: Zuerst wird die Matrizen-DNA denaturiert und gegebenenfalls die beiden Stränge bei doppelsträngiger DNA aufgeschmolzen (Denaturierung). Danach findet eine spezifische Hybridisierung der Primer an die homologe Zielsequenz auf der DNA statt (Anlagerung). Schließlich geht von den Primern die DNA-Synthese aus (Elongation). In der darauf folgenden Amplifikationsrunde kann das so synthetisierte DNA-Fragment als Matrize für den anderen Primer dienen. Auf diese Weise ist in mehreren aufeinander folgenden Zyklen eine exponentielle Anreicherung einer beliebigen DNA-Sequenz, die zwischen den beiden Primern liegt, möglich. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer (für TLR1-9) sind weiter oben angegeben. Die PCR wurde auf einem Stratagene RoboCycler Gradient 40 durchgeführt.

PCR-Reaktionsgemisch (ad 50 μ l):

- je 0,2 mM Primer (Sense und Antisense)
- 1,5 mM Mg^{2+}
- 200 mM dNTP
- 2,5 U Taq Polymerase (Ampli Taq, Perkin Elmer)

PCR-Reaktionsbedingungen:

- 95 °C für 5 min
- 30 Zyklen á:
 - 94 °C für 1 min
 - 63 °C für 1 min
 - 72 °C für 1,5 min
- 4 °C (Abkühlung)

2.3.5 Gelelektrophorese

Die Produkte der PCR wurden auf 1,5 %igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden in der Mikrowelle 3,0 g Agarose mit 200 ml TBE-Puffer zum Kochen gebracht, anschließend 7,5 µl Ethidiumbromid zugegeben und in die Gelwanne gegossen. Nach Abkühlung für eine Stunde wurde das Gel durch Einbringen in die Elektrophorese-Kammer mit TBE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden nach Entfernen des Kammes mit fünffachem Ladepuffer in die Geltaschen eingebracht. Der Ladepuffer enthielt einen Farbstoff, um das Einpipettieren zu erleichtern, sowie Glycerin, das durch seine höhere Dichte das Absinken der Proben in die Taschen beschleunigte.

Das angelegte elektrische Feld wurde auf 90 – 100 mA Stromstärke und einen nichtbegrenzenden Spannungswert eingestellt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente konnte durch die Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid im UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht werden und wurde mit einer Sofortbildkamera dokumentiert.

2.3.6 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (*real-time PCR*)

Die *real-time* PCR ermöglicht eine quantitative Aussage über die untersuchte DNA-Sequenz und damit über die mRNA-Expression bestimmter Proteine. Mittels konventioneller PCR ist dies jedoch nur möglich, solange sich die Reaktion im linearen Bereich der Amplifikationseffizienz befindet, denn in der Plateauphase, die zwangsläufig in jeder Reaktion erreicht wird, lässt sich ein ursprünglicher Mengenunterschied oft nicht mehr feststellen. Mit der *real-time* PCR lässt sich allerdings die gebildete DNA-Menge durch Hinzufügen eines Fluoreszenzfarbstoffes vor Beginn der PCR während der Reaktion messen. Da sich dieser Farbstoff nur an doppelsträngige DNA anlagert, emittieren die Proben nach Anregung mit einem Laser ein zur Menge gebildeter DNA proportionales Signal. Dieses kann nach jeder Elongationsphase mit einer entsprechenden Linse gemessen, im Computer gespeichert und gegen die Zykluszahl aufgetragen werden. Mit geeigneten Referenzproben, deren Kopienzahl bekannt ist, lässt sich schließlich auf die ursprüngliche Kopienzahl in der zu untersuchenden Probe zurückschließen. Um letztendlich eine quantitative Aussage über die mRNA-Expression eines bestimmten Gens zu erhalten, wird die gemessene Kopienzahl auf die Transkriptionszahl eines sogenannten Referenzgens bezogen, welches in jeder Probe zusätzlich bestimmt wird und das so gewählt ist, dass dessen Expression nicht durch den Versuchsansatz beeinflusst wird.

In dieser Arbeit wurden zur Amplifizierung der Zielsequenzen (IP-10 und CCR7) in der *real-time* PCR LightCycler Primer Sets von Search-LC (Heidelberg, D) und der LightCycler FastStart DNA Sybr Green Kit von Roche (Mannheim, D) nach Anleitung der Hersteller verwendet. Dazu wurden 20 μ l pro Glaskapillare von folgendem Master Mix für die *real-time* PCR vorbereitet:

- 2 μ l LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I
- 2 μ l LightCycler Primer Set (IP-10 oder CCR7)
- 6 μ l H₂O PCR-grade
- 10 μ l cDNA template

Dabei enthielten der LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit bereits dNTP, Taq DNA Polymerase sowie PCR-Puffer und das LightCycler Primer Set MgCl₂ in optimaler Konzentration. Parallel dazu wurden Verdünnungsreihen, die aus dem mitgelieferten Standard hergestellt wurden, mitgemessen.

Entsprechend der Anleitung des Herstellers wurde folgendes LightCycler Protokoll verwendet:

- Denaturierung:
95 °C für 10 min
- Amplifikation: 45 Zyklen á
95 °C für 10 s
68 °C für 10 s
72 °C für 16 s
- Schmelzkurve:
95 °C für 0 s
65 °C für 15 s
95 °C für 0 s
- Abkühlung:
40 °C für 30 s

Eine quantitative Aussage wird durch Normalisierung auf sogenannte „*housekeeping genes*“ erreicht, darunter: β -actin, HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase), G6PDH (Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) und Cyclophilin B. Jede Probe wurde in zwei unabhängigen Ansätzen gemessen und der entsprechende Mittelwert gebildet. Die Kopienzahlen der detektierten Zielgene wurden schließlich auf das

Referenzgen Cyclophilin-B normalisiert. In den Abbildungen ist die Zahl der Kopien als Zahl der Transkripte pro μl DNA dargestellt.

2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel + SEM (*Standard error of mean* = Standardfehler des Mittels) angegeben. Falls in einem Versuchsansatz lediglich zwei unabhängige Experimente durchgeführt wurden, so sind die Ergebnisse als Mittelwert \pm Reichweite dargestellt. Dies ist jedoch explizit in der Beschreibung der Abbildung erwähnt. Bei einigen Experimenten wurde zum Vergleich der Mittelwerte ein zweiseitiger Student-t-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen und ist durch Markierung mit einem * angezeigt.

3 Ergebnisse

3.1 Plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen reagieren auf unterschiedliche mikrobielle Stimuli

Zu Beginn der Arbeit war bereits bekannt, dass Subpopulationen dendritischer Zellen sich in den Stimuli, die sie aktivieren, unterscheiden^{40, 70}. Durch die neu entstandene Möglichkeit, hoch aufgereinigte Populationen der beiden Subtypen der dendritischen Zellen des peripheren Blutes (PDC und MDC) zu erhalten⁶⁶, war der erste Teil der Arbeit der Suche nach optimalen Stimuli für myeloide bzw. plasmazytoide dendritische Zellen gewidmet.

Zunächst wurde die Aktivierbarkeit aufgereinigter dendritischer Zellen durch verschiedene bakterielle Stimuli und Wachstumsfaktoren untersucht. IL-3 ist ein bekannter Wachstumsfaktor für plasmazytoide dendritische Zellen, GMCSF (*Granulocyte monocyte colony stimulating factor*) ist der optimale Wachstumsfaktor für myeloide dendritische Zellen. Isolierte PDC und isolierte MDC wurden mit unterschiedlichen Stimuli inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten bezüglich der Expression kostimulatorischer Moleküle (CD80, CD86, CD40) und der MHC-Klasse II Moleküle auf ihrer Oberfläche durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 2).

Bereits ohne Zugabe von Stimuli zeigt sich eine leichte Steigerung in der Expression der analysierten Oberflächenmarker im Verlauf des untersuchten Zeitraums. PDC aber nicht MDC reagierten auf CpG-ODN mit einer starken Hochregulation der CD80, CD86 und CD40 Expression. Im Gegensatz dazu aktivierte LPS (Lipopolysaccharid) MDC, jedoch nicht PDC. Im Vergleich zu PDC, die ohne Stimulus in reinem Medium kultiviert worden waren, zeigten mit ODN 2006 stimulierte PDC nach 48h (Abbildung 2B) eine 4,3-fache Steigerung der Expression von CD80, eine 8,9-fache Steigerung der Expression von CD86, eine 2,6-fache Steigerung in der Expression von CD40 und eine 2-fache Steigerung der Expression von HLA-DR. PDC, die mit CpG 2216 stimuliert worden waren, zeigten dagegen nur eine schwächere Reaktion. Hier war die MFI (*Mean fluorescence intensity* = mittlere Fluoreszenzintensität) von CD80 um das 1,8-fache gegenüber in Medium kultivierten PDC gesteigert, die MFI von CD86 um das 2,9-fache, die MFI von CD40 um das 2,1-fache und die MFI von HLA-DR um das 1,3-fache. Interessanter Weise

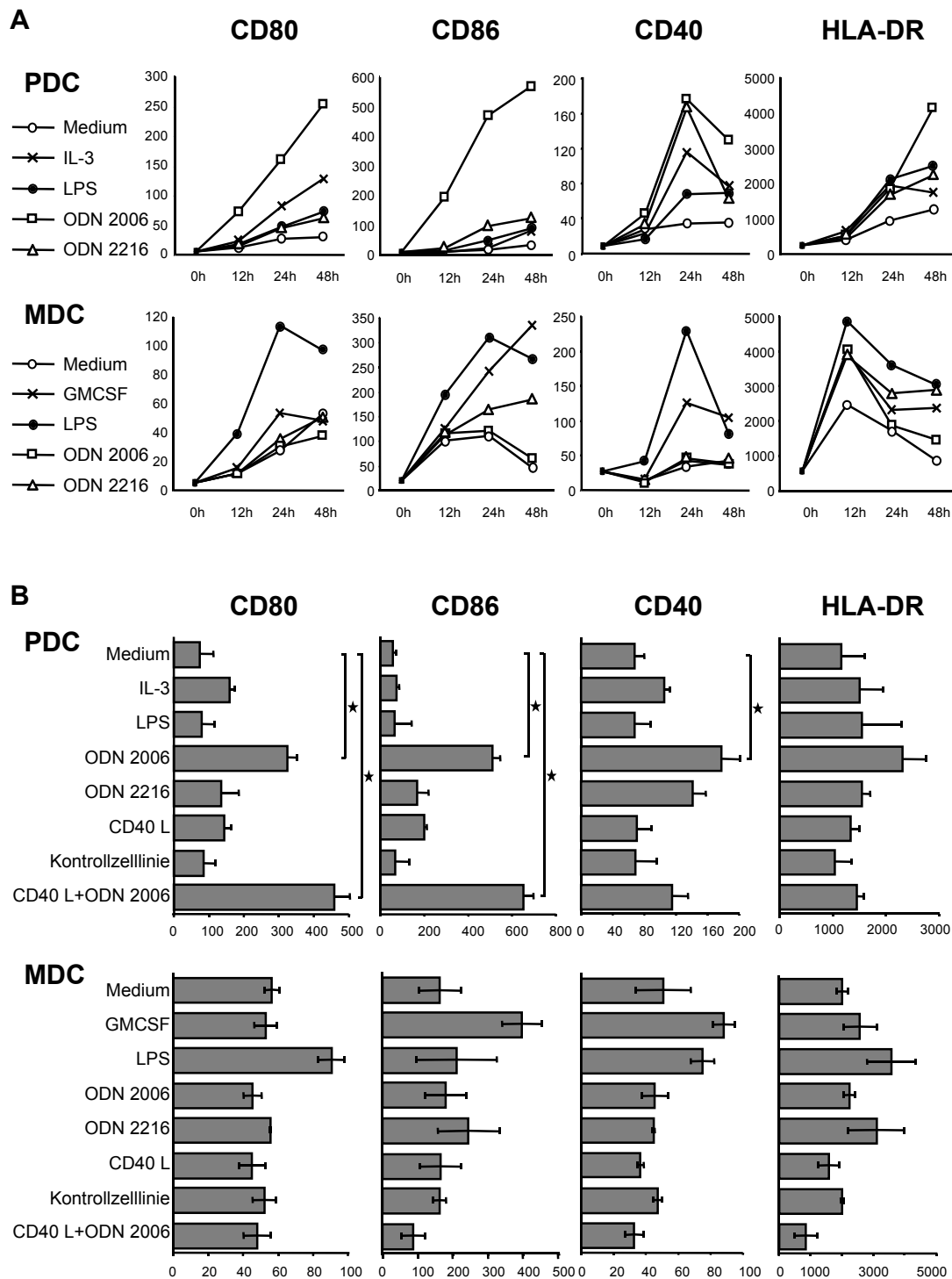


Abbildung 2: Ausschließliche Aktivierung von PDC durch CpG-ODN und von MDC durch LPS. (A) Aufgereinigte PDC und MDC desselben Spenders wurden mit verschiedenen Stimuli inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch auf die MFI der Oberflächenmarker CD80, CD86, CD40 und HLA-DR untersucht. Als Kontrolle für die CD40 Ligation mit einer CD40 Ligand exprimierenden Zelllinie (CD40L) wurde eine identische Zelllinie verwendet, die nicht mit dem CD40 Ligand transfiziert ist. (B) Die MFI von CD80, CD86, CD40 und HLA-DR von aufgereinigten PDC und MDC wurde nach 48 h Inkubation untersucht. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM für PDC ($n=7$) und als Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm Reichweite für MDC dargestellt.

zeigte sich bei den Oberflächenmarkern CD80 und CD86 ein Synergismus zwischen ODN 2006 und CD40 Ligand. Mit ODN 2006 und CD40 Ligand gleichzeitig stimulierte PDC zeigten einen 6,1-fachen Anstieg der Expression von CD80 und sogar einen 11,3-fachen Anstieg der Expression von CD86 gegenüber PDC, die ohne Stimulus kultiviert worden waren.

Insgesamt lässt sich erkennen, dass ODN vom Typ des ODN 2006 ein weit stärkerer Stimulus für die Aktivierung von PDC sind als die bisher bekannten Stimuli IL-3 und CD40 Ligand. Im Gegensatz dazu ließen sich MDC durch die beiden verwendeten CpG-Motive nicht aktivieren, sondern reagierten nur auf LPS bzw. GMCSF.

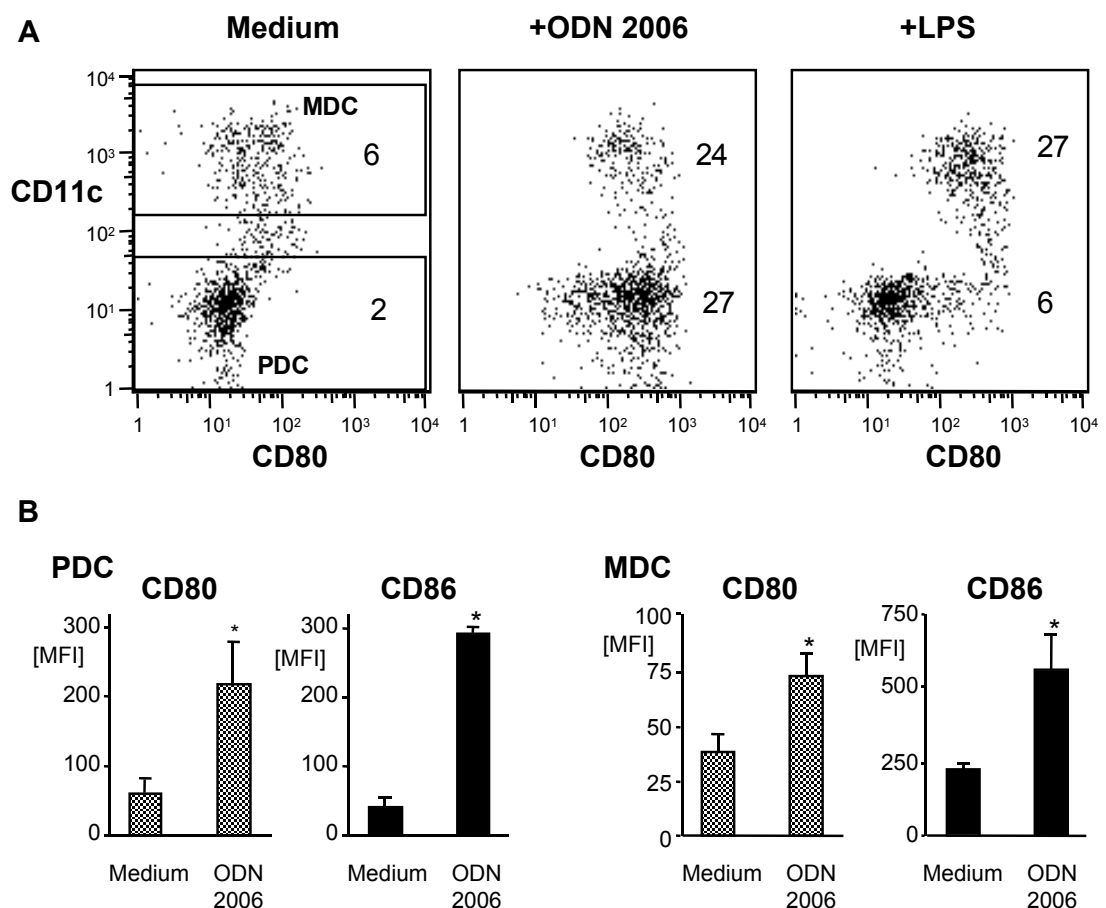


Abbildung 3: ODN 2006 aktiviert beide DC-Subtypen in einer Mischpopulation aus PDC und MDC. (A) Isolierte CD4⁺ DC wurden mit den angegebenen Stimuli für 24 h inkubiert. Die CD80 Expression auf CD11c⁻ PDC und CD11c⁺ MDC wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die MFI ist für beide Zelltypen angegeben. (B) T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten wurden aus PBMC depletiert. Dadurch wurden dendritische Zellen angereichert (PDC 2-18%, MDC 3-10%). PDC (CD123⁺, HLA-DR⁺, lin⁻) und MDC (CD11c⁺, HLA-DR⁺, lin⁻) wurden durchflusszytometrisch auf CD80 und CD86 Expression untersucht.

Während ODN 2006 aufgereinigte MDC nicht aktivierte, zeigte sich in einer gemischten Population aus PDC und MDC, die aus CD4⁺ dendritischen Zellen aus peripherem Blut gewonnen wurde, dass ODN 2006 CD80 auf beiden Zellpopulationen hochregulierte, LPS jedoch nur auf MDC (Abbildung 3 A). In einem weiteren Versuch zeigte sich in PBMCs, in denen dendritische Zellen auf ähnliche Weise angereichert worden waren, dass CD80 und CD86 durch ODN 2006 in beiden beobachteten Subpopulationen von dendritischen Zellen (PDC und MDC) hochreguliert wurden (Abbildung 3 B). Diese beiden Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein durch PDC vermittelter Effekt für die Aktivierung von MDC durch CpG-ODN verantwortlich ist, da ein direkter Effekt nach den Ergebnissen der oben erwähnten Versuche ausgeschlossen werden kann.

3.1.1 Expression verschiedener TLRs in dendritischen Zellen

Unter der Annahme, dass für die unterschiedliche Reaktion von PDC und MDC auf CpG-ODN und LPS eine unterschiedliche Expression der für die Erkennung verantwortlichen

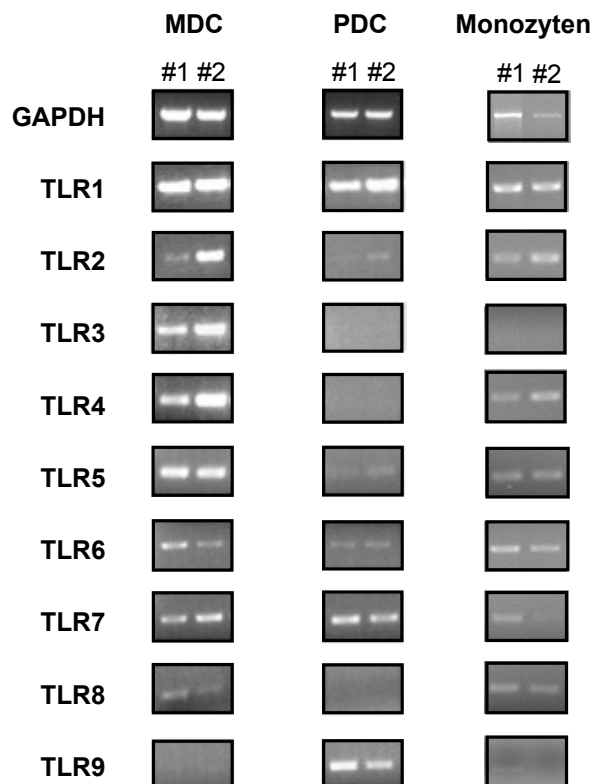


Abbildung 4: Toll-Like-Rezeptor Expression von PDC und MDC. Mittels rt-PCR wurde in frisch isolierten PDC, MDC und Monozyten auf mRNA-Ebene die Expression von TLR1 bis TLR9 gemessen. Ergebnisse eines repräsentativen Experiments mit zwei unabhängigen Spendern sind gezeigt. (Experiment in Zusammenarbeit mit Robert Bals durchgeführt.)

TLRs in diesen beiden Zelltypen verantwortlich sein könnte, wurden frisch isolierte und aufgereinigte PDC und MDC mittels RT-PCR auf die Expression der TLR 1-9 untersucht und der TLR-Expression aufgereinigter Monozyten gegenüber gestellt (Abbildung 4).

Es ist deutlich zu erkennen, dass PDC und MDC sich im Muster ihrer exprimierten TLRs stark unterscheiden. TLR1 und TLR7 werden in beiden Zelltypen gleich exprimiert. Transkripte von TLR3 und TLR4 wurden nur in MDC gefunden, während TLR9 ausschließlich in PDC vorhanden war. Schwache Expression von TLR6 und TLR8 konnte ebenfalls nur in MDC festgestellt werden. Insgesamt ist das Muster der Ausprägung von TLRs in MDC und Monozyten viel ähnlicher als im Vergleich dieser beiden Zelltypen zu PDC. Expression von TLR9 und Mangel an TLR4 korreliert mit der Fähigkeit von PDC, auf CpG-ODN zu reagieren, nicht jedoch auf LPS. Der Nachweis von TLR4, nicht aber von TLR9, erklärt die Stimulierbarkeit von MDC durch LPS und ihre Nicht-Stimulierbarkeit durch CpG-ODN.

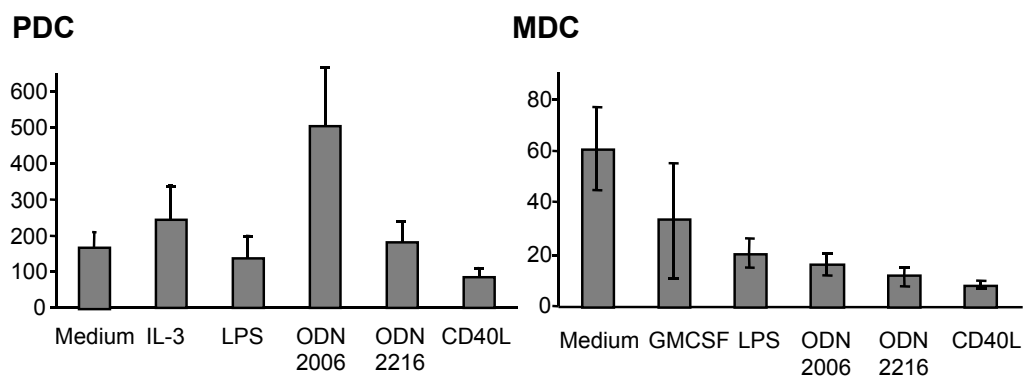


Abbildung 5: Das Überleben von aufgereinigten PDC wird durch ODN 2006 gefördert. Isolierte PDC wurden mit den angegebenen Stimuli für 48 h inkubiert. Tote Zellen wurden mit To-Pro-3 angefärbt. Die relative Zahl lebender Zellen wurde durch Zugabe einer definierten Menge an *calibration beads* zu jeder Probe bestimmt und ist als Zahl To-Pro negativer Zellen (= lebende Zellen) pro 100 beads angegeben. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM für PDC (n=6) und als Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten \pm Reichweite für MDC dargestellt.

3.2 Charakterisierung der Effekte von CpG-

Oligodesoxynukleotiden auf plasmazytoide dendritische Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurde in funktionellen Untersuchungen die Wirkung von CpG-ODN auf PDC im Detail untersucht, da sich nur diese unter den dendritischen Zellen des peripheren Blutes als direkte Zielzellen von CpG-ODN erwiesen hatten.

3.2.1 ODN 2006 fördert das Überleben von plasmazytoiden dendritischen Zellen, Reifung und Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression

Isolierte PDC und MDC zeigen in Kultur die Tendenz, sehr schnell zu sterben, wenn nicht spezifische Wachstumsstimulatoren anwesend sind. In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass ODN 2006 das Überleben von PDC nach 48 h Inkubation begünstigt (um das 3-fache gegenüber der Mediumkontrolle). IL-3 konnte das Überleben nur um das 1,4-fache steigern, während CD40 Ligand, LPS und ODN 2216 das Überleben von PDC nicht verbessern konnten (Abbildung 5). Das Überleben von MDC nach 48 h konnte durch keinen der in den Versuchen eingesetzten Stimuli gesteigert werden.

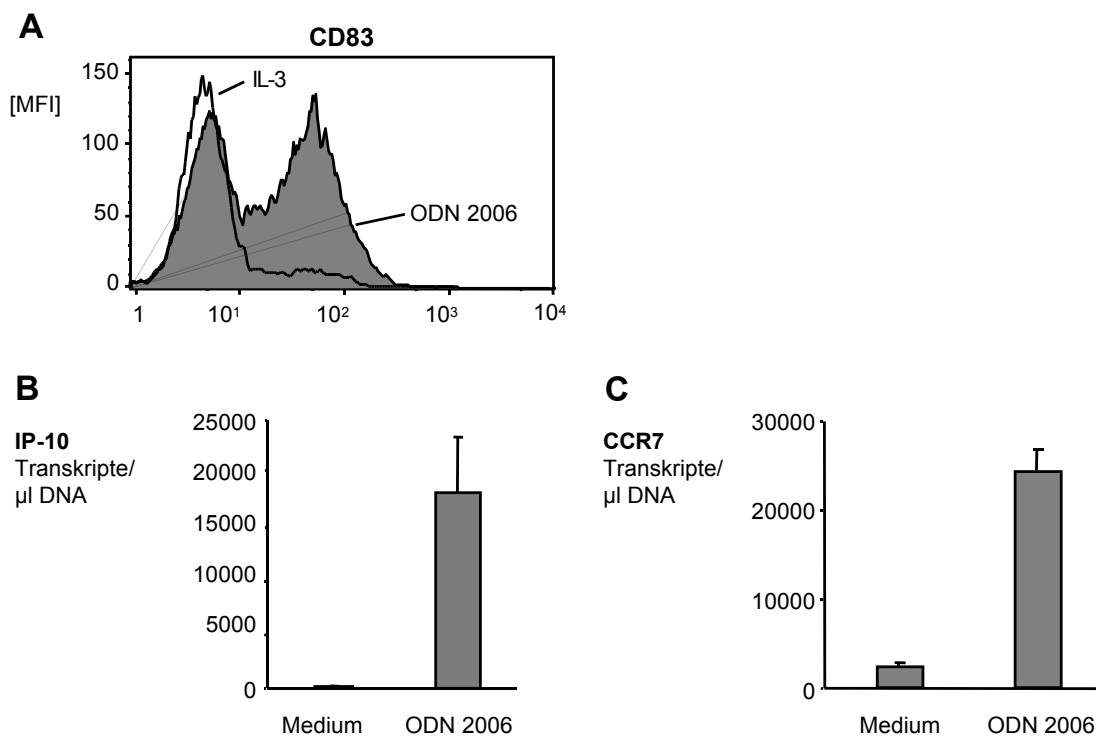


Abbildung 6: Expression von Reifemarkern, IP-10 und CCR7 auf ODN 2006-aktivierten PDC. (A) Aufgereinigte PDC wurden mit ODN 2006 (grau) oder IL-3 (weiß) für 48 h inkubiert und danach durchflusszytometrisch auf CD83 analysiert. (B, C) Isolierte PDC wurden mit ODN 2006 oder ohne Stimulus für 3 h kultiviert. CCR7 mRNA (B) und IP-10 mRNA (C) wurden mit quantitativer rt-PCR gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM gezeigt (n=3). (Experimente 6 B,C in Zusammenarbeit mit Thomas Giese durchgeführt)

PDC zeigten nach 48 h Inkubation mit ODN 2006 eine Steigerung der Expression des Reifestimulus CD83, die durch IL-3 nicht hervorgerufen werden konnte (Abbildung 6). Die Transkription von mRNA für CCR7 und IP-10 wurde durch ODN 2006 gegenüber der Mediumkontrolle deutlich gesteigert (Abbildung 6 B, C). Die Expression von CXCR3 wurde weder durch ODN 2006 noch durch ODN 2216 beeinflusst, CCR7 hingegen wurde auf

PDC nach Stimulation durch ODN 2006 bereits innerhalb der ersten Stunden nach Beginn der Inkubation hochreguliert. Auch nach Stimulation mit ODN 2216 wurde CCR7 hochreguliert, jedoch im Vergleich mit Stimulation durch ODN 2006 erst verzögert. IL-3 zeigte im Vergleich zur Mediumkontrolle keinen Einfluss auf die Expression von CCR7 bzw. CXCR3 (Abbildung 7).

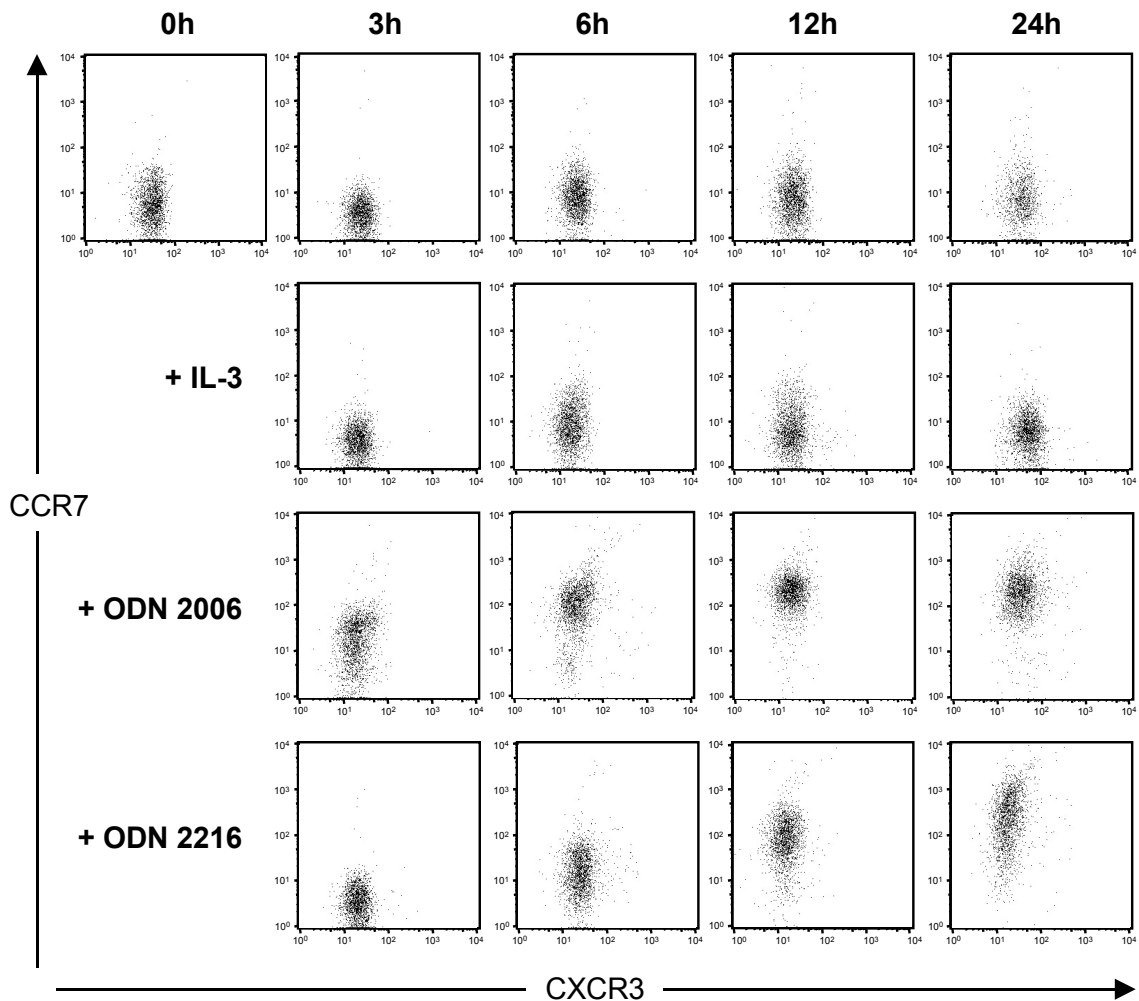


Abbildung 7: CpG-ODN führen zu einer gesteigerten Expression von Chemokin-Rezeptoren. Isolierte PDC wurden ohne Stimulus (oberste Zeile), mit IL-3, ODN 2006 oder ODN 2216 inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die PDC durchflusszytometrisch auf Expression von CCR7 und CXCR3 untersucht.

3.2.2 PDC produzieren nur nach synergistischer Stimulation mit CpG und CD40 Ligand bioaktives IL-12p70

Die Analyse der von PDC und MDC produzierten Menge an IFN- α und IL-12 nach Stimulation für 48 h mit verschiedenen Stimuli zeigte deutliche Unterschiede. Während MDC fast kein IFN- α sezernieren, konnten im Überstand der stimulierten PDC-Proben zum Teil große Mengen an IFN- α detektiert werden (Abbildung 8). Während die mit ODN

2006 allein stimulierten PDC im Bereich der mit IL-3, LPS oder CD40 Ligand stimulierten PDC lagen (4-, 4,4-, 2,9-, bzw. 6,5-fache Steigerung der IFN- α Sekretion gegenüber unstimulierten Proben), produzierten mit ODN 2006 und CD40 Ligand zugleich stimulierte PDC gegenüber unstimulierten PDC eine um das 43-fache (11,5-fach gegenüber ODN 2006 bzw. 6,6-fach gegenüber CD40 Ligand) höhere Menge an IFN- α .

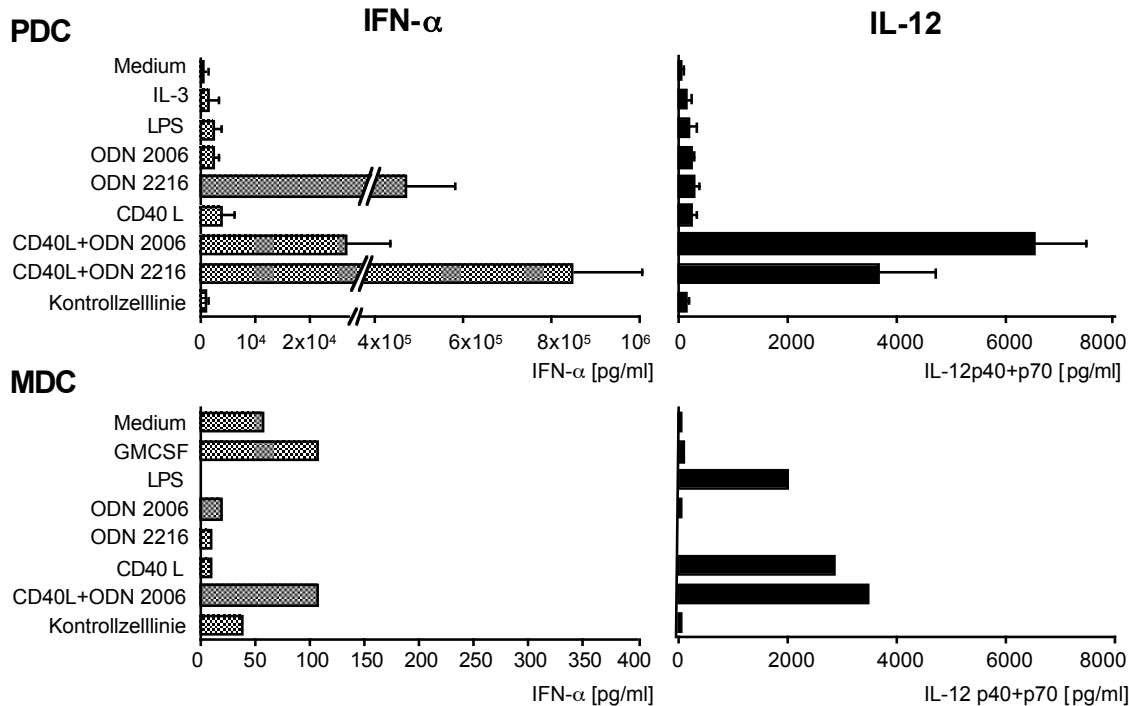


Abbildung 8: Produktion von IFN- α und IL-12 von PDC und MDC nach Aktivierung mit verschiedenen Stimuli. Isolierte PDC und MDC wurden mit den angegebenen Stimuli für 48 h inkubiert. Als Kontrolle für die CD40 Ligation mit einer CD40 Ligand exprimierenden Zelllinie (CD40L) wurde eine identische Zelllinie verwendet, die nicht mit dem CD40 Ligand transfiziert ist. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM für PDC ($n=5$ für IFN- α , $n=6$ für IL-12) und als Mittelwerte für MDC ($n=2$) gezeigt.

Die bekannt hohe IFN- α Produktion durch PDC nach Stimulation mit ODN 2216⁷⁹ konnte reproduziert werden (775-fache Steigerung gegenüber unstimulierten PDC). Eine weitere Steigerung der IFN- α Produktion auf das 1396-fache des Mediumwertes gelang durch Kombination mit CD40 Ligand. Die synergistische Steigerung der Kombination von CD40 Ligand und ODN 2216 fiel dabei jedoch nicht so deutlich aus wie bei der Kombination von CD40 Ligand mit ODN 2006 (1,8-fach gegenüber ODN 2216 bzw. 215-fach gegenüber CD40 Ligand).

Der Synergismus von CpG-ODN mit CD40 Ligand zeigte sich in noch deutlicherem Maße bei der Analyse der Überstände auf IL-12. PDC produzierten nur nach Stimulation mit einer Kombination von ODN 2006 bzw. 2216 mit CD40 Ligand große Mengen an IL-12. Hierbei lag die Zytokinproduktion bei Stimulation durch ODN 2006 und CD40 Ligand

jedoch höher (31-fache Steigerung gegenüber unstimulierten PDC) als bei Stimulation durch ODN 2216 und CD40 Ligand (27-fach gegenüber unstimulierten PDC). Kein Synergismus konnte durch die Kombination von IL-3 oder LPS und CD40 Ligand festgestellt werden (Abbildung 9). Kontrollexperimente belegten, dass in der Tat die Expression des CD40 Liganden und nicht andere Eigenschaften der CD40 Ligand exprimierenden Zelllinie, die in diesen Experimenten zur CD40 Ligation verwendet wurde, für die beobachteten Effekte verantwortlich war (Abbildung 8 und nicht gezeigte Daten).

MDC ließen sich durch keines der verwendeten CpG-ODN zu IL-12-Produktion anregen, reagierten aber auf LPS und CD40 Ligand mit einer gesteigerten IL-12-Produktion. Jedoch konnte bei MDC kein Synergismus zwischen CD40 Ligand und einem anderen Stimulus nachgewiesen werden. Die bioaktive Form von IL-12, IL-12 p70 konnte nur in Überständen aus Kulturen von PDC, die mit CD40 Ligand in Kombination mit CpG-ODN stimuliert worden waren, nachgewiesen werden (137,28 pg/50000 Zellen [SEM 71,4] nach Stimulation mit ODN 2006 und CD40 Ligand, 163,35 pg/50000 Zellen [SEM 59,3] nach Stimulation mit ODN 2216 und CD40 Ligand).

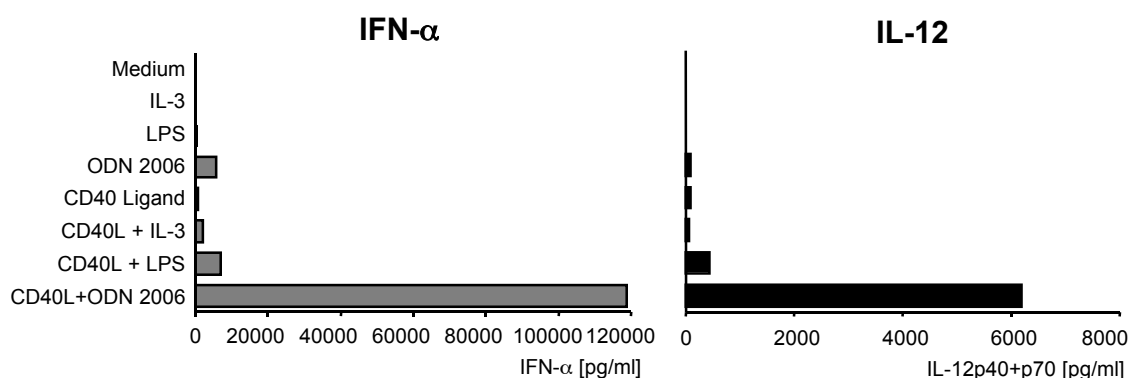


Abbildung 9: ODN 2006 zeigt einen deutlichen Synergismus mit CD40 Ligand in der Produktion von IFN- α sowie IL-12 durch aufgereinigte PDC. Isolierte PDC wurden für 48 h mit den angegebenen Stimuli inkubiert und anschließend im Überstand IFN- α und IL-12 im ELISA gemessen.

Um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt innerhalb der 48-stündigen Inkubation die Zytokinproduktion nach Stimulation durch die CpG-ODN 2006 bzw. 2216 stattfindet, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden Triplikate angesetzt, von denen zu den Zeitpunkten 12, 24 oder 48 Stunden Überstände abgenommen und analysiert wurden. Zum anderen wurden bei immer denselben Zellen zu eben diesen Zeitpunkten Überstände abgenommen, die Zellen gewaschen und das Medium ersetzt. Es stellt sich dar, dass nach Stimulation mit ODN 2006 sowohl die IFN- α als auch die IL-12-Produktion im Wesentlichen in den ersten zwölf Stunden stattfindet. Während unter Stimulation mit

ODN 2216 die IL-12-Produktion zeitlich einen fast identischen Verlauf wie nach Stimulation mit ODN 2006 zeigt, weist die deutlich höhere IFN- α -Produktion nach Stimulation mit ODN 2216 ein zeitverzögertes Maximum nach 12-24 Stunden auf (Abbildung 10).

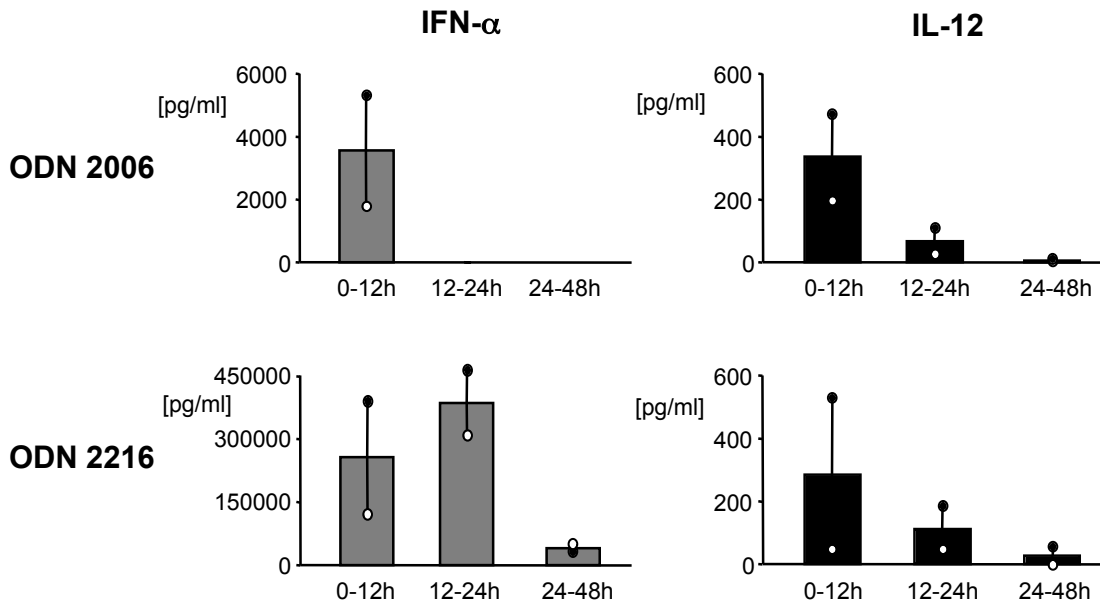


Abbildung 10: Kinetik der IFN- α und IL-12 Produktion durch PDC. Isolierte PDC wurden mit ODN 2006 bzw. ODN 2216 stimuliert. Der Überstand wurde nach 12 h entfernt, die Zellen gewaschen und für weitere 12 h ohne erneuten Stimulus kultiviert. Dann wurde der Überstand wiederum entfernt und die Zellen in frischem Medium für weitere 24 h inkubiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Reichweite von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt (verschiedene Spender sind durch unterschiedliche Symbole dargestellt).

3.2.3 Das Verhältnis der produzierten Menge an IFN- α und IL-12 wird bestimmt vom Differenzierungsgrad der plasmazytoiden dendritischen Zellen

Weitere Versuche sollten die Frage beantworten, ob die Differenzierungsstufe der PDC die Produktion der Zytokine beeinflusst. Dazu wurden die Zellen nach einer unterschiedlich langen Vorinkubation mit IL-3 für weitere 48 Stunden stimuliert. Die Fähigkeit von PDC, IFN- α nach Stimulation mit ODN 2216 zu produzieren, ging mit der Dauer der Vorinkubation merklich zurück (Abbildung 11 A). Die geringe Produktion von IL-12 nach alleiniger Stimulation mit ODN 2216 lag ab 24 Stunden Dauer der Vorinkubation sogar unter der Menge, die durch den Wachstumsstimulus IL-3 hervorgerufen worden war.

Bei Stimulation durch CpG 2006 in Kombination mit CD40 Ligand sank zwar mit längerer Vorinkubation mit IL-3 die Produktion von IFN- α , die sezernierte IL-12-Menge nahm hingegen zu (Abbildung 11 B). Der Grund dafür, dass auch die alleinige Stimulation mit CD40 Ligand schon eine deutlich höhere IL-12 Produktion hervorrief als in den Versuchen ohne Vorinkubation mit IL-3, ist wahrscheinlich auf die durch IL-3 hervorgerufene Steigerung der Expression des CD40 Oberflächenantigens zurückzuführen (Steigerung des MFI um das 5-fache zwischen dem 17- und 67-Stunden-Wert).

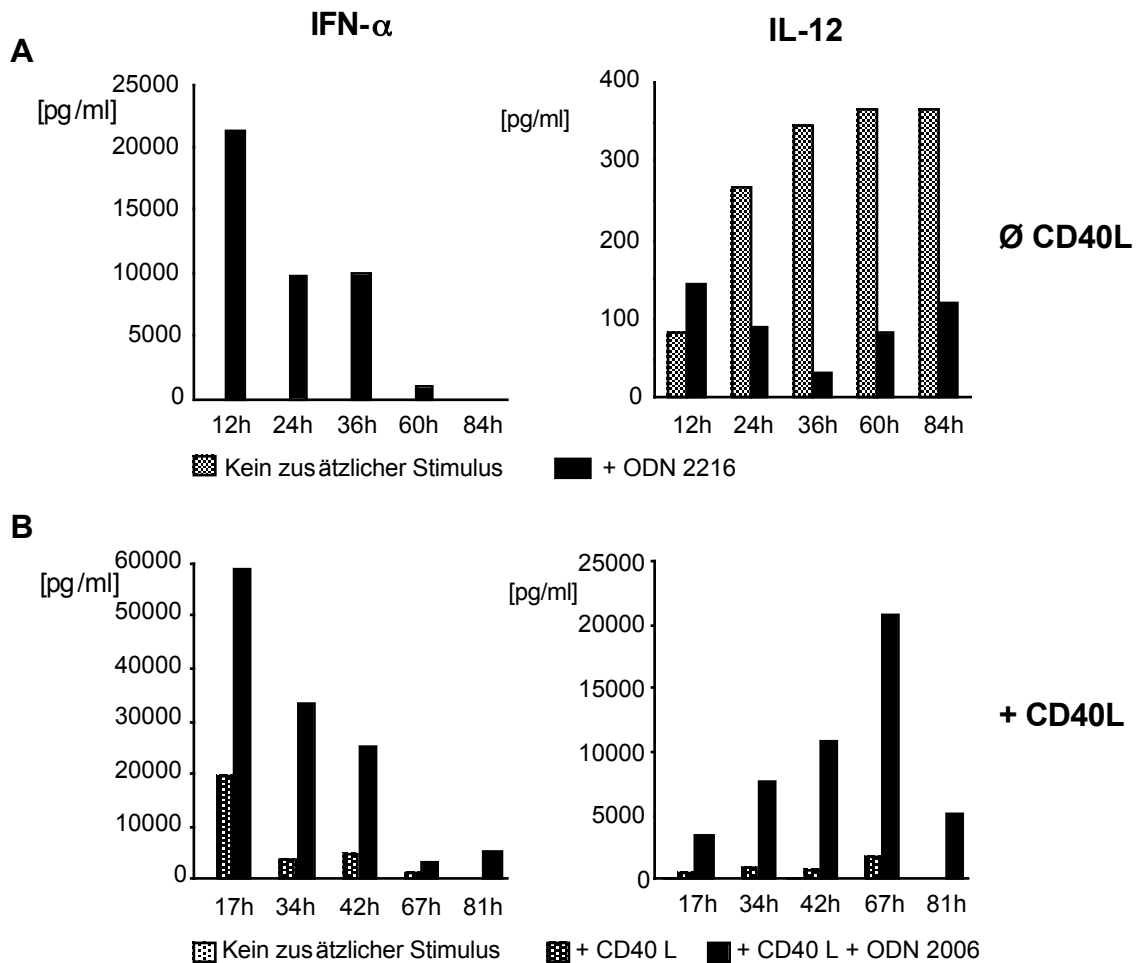


Abbildung 11: Produktion von IFN- α und IL-12 durch PDC nach Vorinkubation mit IL-3 in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad. PDC wurden für die an der Abszisse angegebene Zeit mit IL-3 vorinkubiert und anschließend für weitere 48 h mit den Stimuli ODN 2216 (A) bzw. CD40 Ligand oder CD40 Ligand in Kombination mit ODN 2006 (B) kultiviert.

Bioaktives IL-12 p70 konnte wiederum nur in Proben detektiert werden, die mit ODN 2006 und CD40 Ligand gleichzeitig stimuliert worden waren (41,1 pg/200000 Zellen nach 17 h Vorinkubation, 80,6 pg/200000 Zellen nach 34 h Vorinkubation, 139,0 pg/200000 Zellen nach 42 h Vorinkubation, 290,9 pg/200000 Zellen nach 67 h Vorinkubation).

3.2.4 ODN 2006 steigert die Fähigkeit von plasmazytoiden dendritischen Zellen, Proliferation von naiven CD4 T-Zellen zu induzieren

Um zu untersuchen, ob PDC in ihrer Funktion als Antigen-präsentierende dendritische Zellen naive CD4 T-Zellen zur Proliferation anregen können, wurden isolierte PDC, die für sechs Stunden bzw. drei Tage mit ODN 2006, CD40 Ligand oder ohne Stimulus

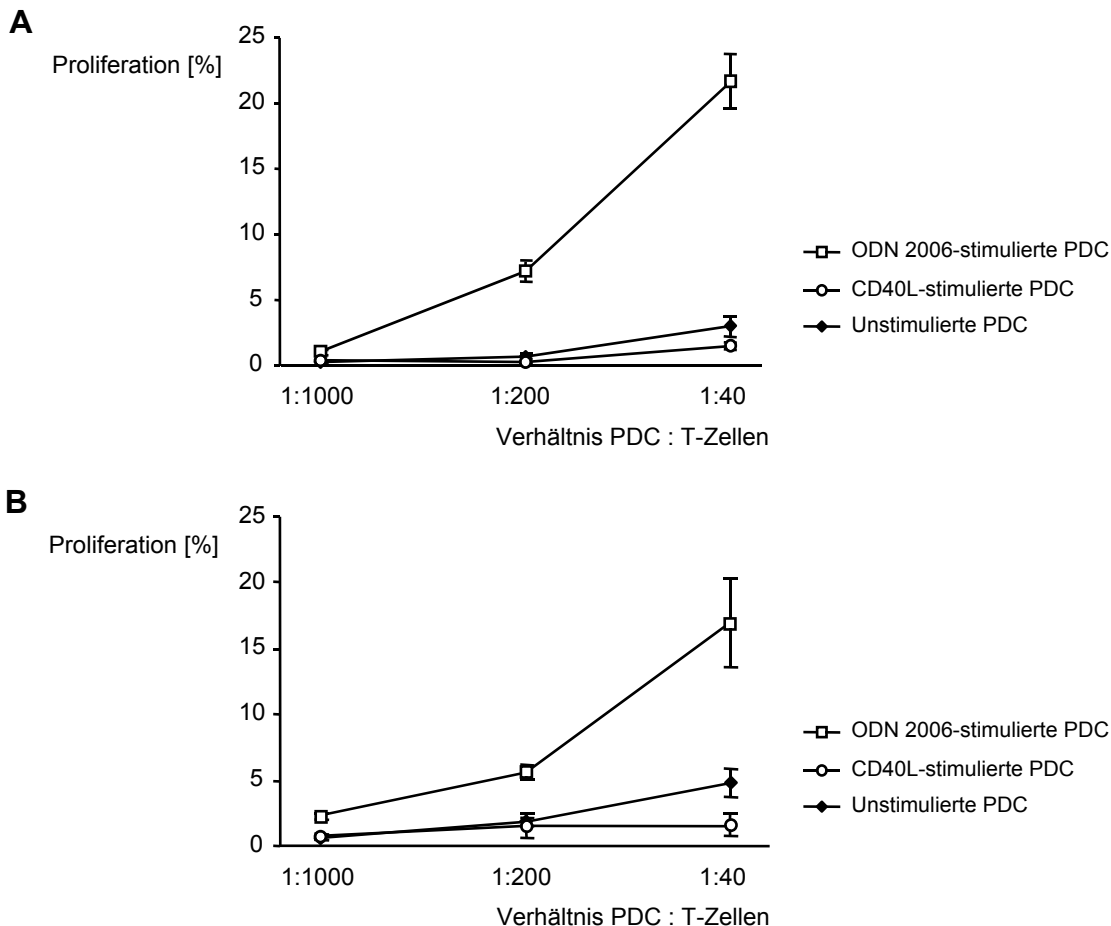


Abbildung 12: Mit ODN 2006 stimulierte PDC induzieren Proliferation von naiven CD4 T-Zellen. (A) PDC wurden mit ODN 2006 für 6 h vorinkubiert und dann als Stimulatorzellen in einer Kokultur mit allogenen naiven CD4 T-Zellen eingesetzt. Nach fünf Tagen wurde die Proliferation der CD4 T-Zellen analysiert. (B) PDC wurden mit ODN 2006 für 3 Tage vorinkubiert und dann als Stimulatorzellen in einer Kokultur mit allogenen naiven CD4 T-Zellen eingesetzt. Nach fünf Tagen wurde mittels CFSE-Färbung die Proliferation der CD4 T-Zellen analysiert und der Anteil der geteilten Zellen in Prozent an der Ordinate angegeben. Es sind jeweils die Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt.

vorinkubiert worden waren, für weitere fünf Tage in verschiedenen Verhältnissen mit CFSE-gefärbten naiven allogenen CD4 T-Zellen kokultiviert. Nach Ablauf dieser Frist wurde die Proliferation der CD4 T-Zellen gemessen. Dabei wurden alle Zellen, die CD4 positiv waren und eine niedrigere CFSE-Intensität aufwiesen als der Peak der ungeteilten

Zellen, als mindestens einmal geteilt angesehen. Für sechs Stunden mit ODN 2006 stimulierte PDC waren potenter in der Stimulation von T-Zell-Proliferation als es mit CD40 Ligand oder nicht stimulierte PDC waren (Abbildung 12 A). Auch nach dreitägiger Vorinkubation waren die mit ODN 2006 stimulierten PDC potenter in der Induktion von T-Zell-Proliferation als mit CD40 Ligand oder nicht stimulierte PDC (Abbildung 12 B). Hier muss jedoch angemerkt werden, dass sich der Effekt zum Teil auch durch das gesteigerte Überleben der PDC in der Vorinkubation mit ODN 2006 gegenüber CD40 Ligand oder ohne Stimulus erklären lässt. Denn wie in den oben dargestellten Versuchen deutlich wurde, muss man eine Reduktion der Zahl an viablen PDC nach dreitägiger Inkubation ohne Stimulus annehmen.

3.2.5 Mit ODN 2006 und CD40 Ligand gleichzeitig stimulierte plasmazytoide dendritische Zellen induzieren IL-12-abhängig eine Th1-Antwort

Um die Th1 – Th2 Polarisation der proliferierenden T-Zellen nach Aktivierung durch die PDC zu untersuchen, wurden die CD4 positiven Zellen durchflusszytometrisch auf ihre IL4, IL-10 und IFN- γ Produktion hin analysiert. Zunächst wurden PDC für 60 Stunden mit IL-3 vorinkubiert und anschließend für sechs Stunden mit den Stimuli CpG 2006, CD40 Ligand sowie ODN 2006 + CD40 Ligand stimuliert. In einem festen Verhältnis von 1:10 wurden dann die so vorstimulierten PDC mit naiven allogenen CD4 T-Zellen für sechs Tage kokultiviert. Am sechsten Tag wurde das Zytokinprofil der T-Zellen nach Stimulation mit PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) und Ca-Ionomycin analysiert.

Als Ergebnis zeigte sich, dass weder CD40 Ligand noch ODN 2006 alleine in der Lage waren, eine eindeutige Polarisation der T-Zell-Proliferation herbeizuführen. Die Kombination beider Stimuli jedoch verringerte die Prozentzahl der IL-4 produzierenden T-Zellen und erhöhte die der IFN- γ produzierenden T-Zellen (Abbildung 13 A). Um zu klären, welches der nach gleichzeitiger Stimulation mit ODN 2006 und CD40 Ligand produzierten Zytokine für diese Th1-Polarisation verantwortlich war, wurden blockierende Antikörper gegen IFN- α bzw. IL-12 eingesetzt (Abbildung 13 A). Dadurch ließ sich zeigen, dass die bei Stimulation der PDC mit ODN 2006 + CD40 Ligand beobachtete Th1-Polarisation der

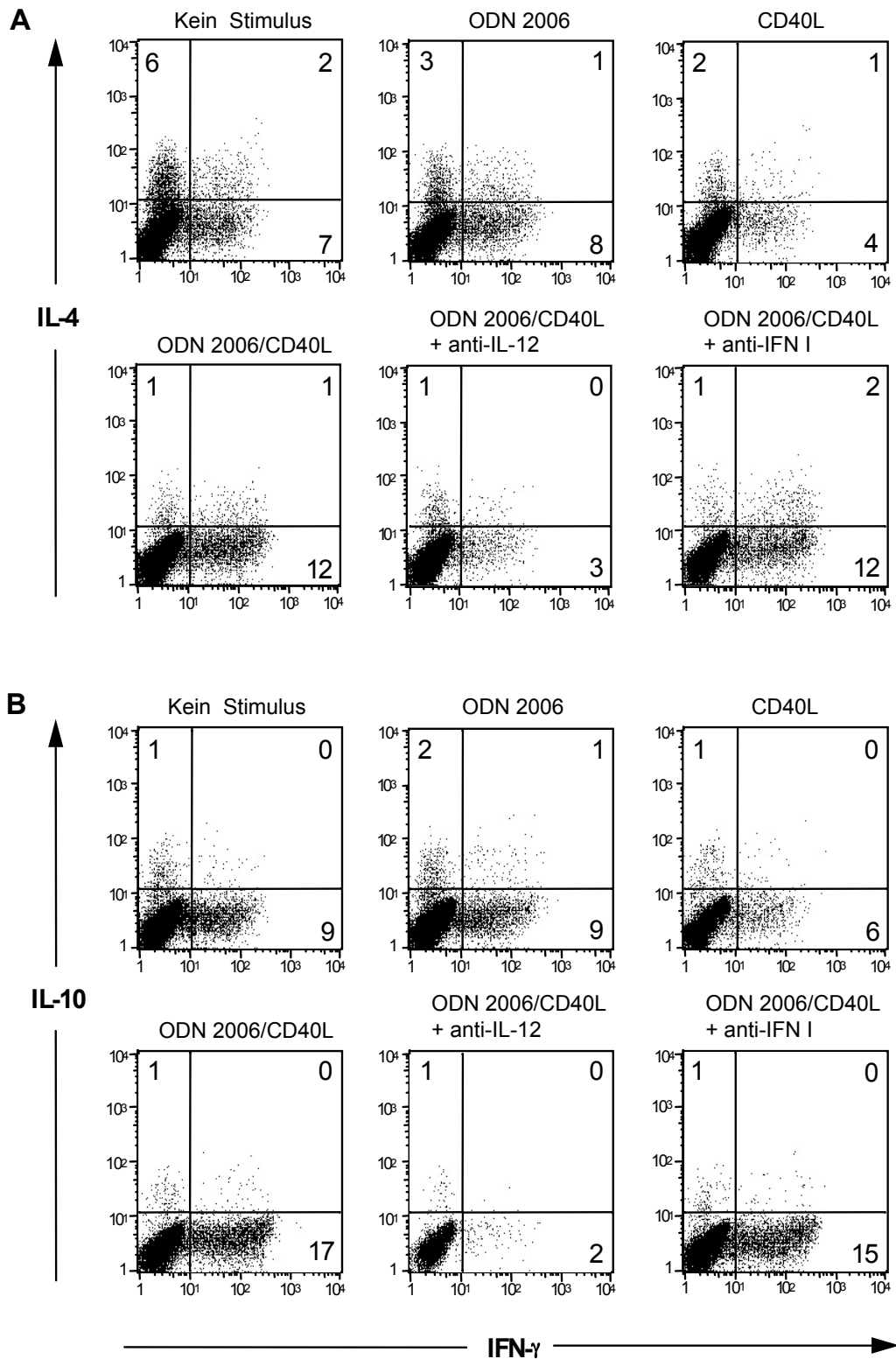


Abbildung 13: PDC, die mit ODN 2006 und CD40 Ligand stimuliert wurden, induzieren eine IL-12 abhängige Th1-Antwort. PDC wurden mit IL-3 für 60 h vorinkubiert. Nach sechsständiger Stimulation mit den angegebenen Stimuli wurden sie mit allogenen naiven T-Zellen koinkubiert. Nach 6 Tagen wurde die Produktion von IL-4 (A), IL-10 (B) sowie IFN- γ der T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin mittels intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch dargestellt. Effekte von IFN Typ I und IL-12 wurden mit neutralisierenden Antikörpern geblockt, wo angegeben.

naiven T-Zellen abhängig war von IL-12, jedoch nicht von IFN- α . Eine Veränderung der Prozentzahl der IL-10 und IFN- γ oder der nur IL-10 produzierenden T-Zellen ließ sich hingegen nicht beobachten (Abbildung 13 B).

3.2.6 Die Aktivierung der PDC durch ODN 2006 ist CpG-Motiv abhängig

Zur Überprüfung der Spezifität des beobachteten stimulatorischen Effekts durch ODN 2006 wurde dieses Oligonukleotid in einer Versuchsanordnung mit leicht abgewandelten verwandten Oligonukleotiden, zum Teil mit Diester-Rückgrat statt Phosphorothioat-Rückgrat, verglichen. Dazu wurde auf isolierten PDC die Expression von CD86 bestimmt. Durch Ersetzen der CG-Sequenz im Phosphorothioat-ODN 2006 durch eine GC-Sequenz (ODN 2137) nimmt die stimulatorische Kapazität ab, es bleibt jedoch ein geringe Restaktivität bestehen (Abbildung 14).

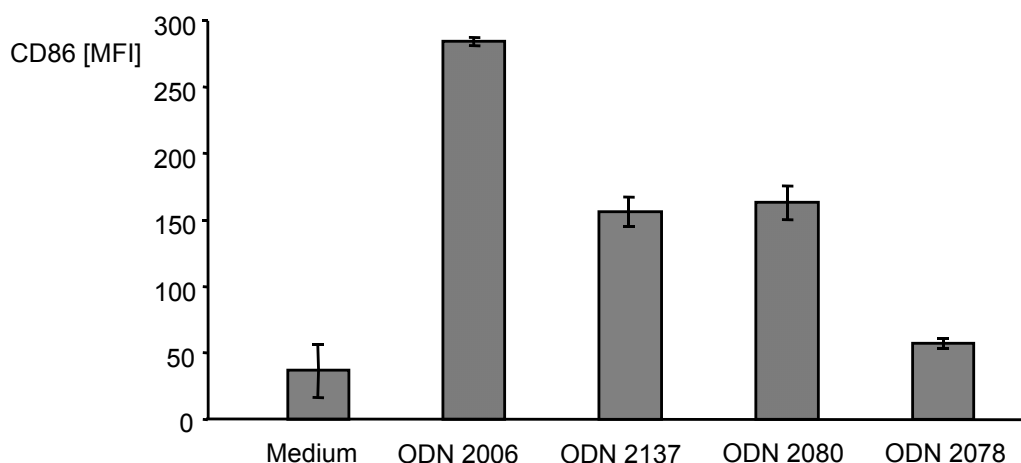


Abbildung 14: Die Wirkung von ODN 2006 auf PDC ist durch die CG-Dinukleotide bestimmt. Isolierte PDC wurden 48 h mit den angegebenen Stimuli inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch auf ihre Expression von CD86 untersucht. Die Phosphorothioat-modifizierten ODN 2006 und 2137 wurden einmalig in der Konzentration 6 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, die Phosphodiester ODN 2080 (CG) und 2078 (GC) wurden zum Beginn der Kultur und erneut nach 6 Stunden in der Konzentration 30 $\mu\text{g/ml}$ verwendet, da sie von Nukleasen degradiert werden.

Beim Vergleich der Diester-ODN 2080 (analog ODN 2006) und 2078 (analog ODN 2137) zeigt sich bei Vertauschen der Nukleotide im ODN ein weiterer Abfall des Effekts bis auf Mediumniveau. Die dargestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Stimulatoren zur Aktivierung der PDC beitragen, aber der Effekt der CpG-Sequenz den stimulatorischen Effekt des Phosphorothioat-Rückgrats überwiegt.

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von MDC und PDC auf die mikrobiellen Stimuli CpG-ODN und LPS charakterisiert und mit der unterschiedlichen Expression von TLR9 und TLR4 auf den beiden Zellen der molekulare Mechanismus für das unterschiedliche Ansprechen auf LPS und CpG-ODN beschrieben.

Es zeigte sich, dass isolierte PDC nur nach Stimulation mit CpG-ODN Aktivierungsmarker hoch regulierten, isolierte MDC dagegen nur nach Stimulation mit LPS. Allerdings wurden MDC durch CpG-induzierte Faktoren indirekt aktiviert. In der Analyse der nach Stimulation produzierten Zytokine zeigte sich, dass PDC nach Stimulation mit ODN 2216 große Mengen an IFN- α sezernieren. ODN 2006 benötigt jedoch die synergistische Stimulation mit CD40 Ligand transfizierten Zellen, um große Mengen an IFN- α induzieren zu können. Im Vergleich hierzu erwies sich die IFN- α Produktion durch MDC als äußerst gering. IL-12 hingegen wurde bei optimaler Stimulation von beiden Zelltypen in vergleichbarer Größenordnung produziert. Jedoch zeigte sich wiederum, dass MDC mit LPS und CD40 Ligand auf andere Stimuli reagierten als PDC, die nur nach Inkubation mit CpG-Oligonukleotiden (ODN 2006 oder ODN 2216) in Kombination mit CD40 Ligand IL-12 produzierten.

Das Muster der TLR-Expression auf RNA-Ebene erklärte die in der Zellkultur erhobenen Befunde. Während TLR9, der Rezeptor für CpG-ODN, in PDC exprimiert wurde, war dieser Rezeptor in der mRNA von MDC nicht nachzuweisen. mRNA für TLR4 hingegen, der für die Erkennung von LPS notwendig ist, war nur in MDC vorhanden, nicht jedoch in PDC.

Die weitere Analyse der Wirkung von CpG-ODN auf PDC zeigte, dass CpG-ODN in PDC zusätzlich ein verbessertes Überleben, die Ausreifung lymphotoper Chemokinrezeptoren, und die Aktivierung sowie Produktion von inflammatorischen Chemokinen stimulieren. Durch Vorinkubation von PDC mit IL-3 wurde das Verhältnis der auf synergistische Stimulation durch ODN 2006 und CD40 Ligand hin produzierten Zytokine IFN- α und IL-12 in Richtung IL-12 verschoben.

ODN 2006-stimulierte PDC waren in der Lage, in einer MLR (*Mixed lymphocyte reaction*) naive allogene CD4 T-Zellen zur Proliferation anzuregen. PDC, die mit einer Kombination aus CpG-ODN und CD40 Ligand stimuliert wurden, zeigten eine IL-12 abhängige Th1-Induktion.

Experimente mit Kontroll-ODN zeigten die Abhängigkeit beobachteter Effekte von der Anwesenheit von CpG-Motiven.

4.2 Eigene Befunde im Vergleich mit der Literatur

Zahlreiche Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren der Forschung mit TLR und ihren Liganden zugewandt. Damit ist auch die Zahl der Veröffentlichungen zu diesem Thema stark angewachsen. Es gibt mehrere Arbeiten, die zum Teil ähnliche Versuchsansätze benutzten, um verwandte Fragestellungen zu beantworten.

4.2.1 Toll-like Rezeptoren auf verschiedenen dendritischen Zellen des peripheren Blutes

Seit der Entdeckung der Toll-like Rezeptoren, vor allem aber seit der Identifizierung ihrer Liganden, ist es von großem Interesse, welche Kombination von TLRs auf den verschiedenen Zellen des humanen Immunsystems exprimiert wird. So haben Kadowaki *et al.* in ihrer Arbeit Subpopulationen humaner dendritischer Zellen auf die Expression der Toll-like Rezeptoren 1 bis 10 hin untersucht⁵⁵. Die in ihrer Arbeit verwendeten *plasmacytoid pre-DC* entsprechen den in der vorliegenden Arbeit untersuchten PDC. Statt direkt aus dem Blut isolierte MDC verwendeten sie jedoch fünf Tage mit GM-CSF und IL-4 inkubierte Monozyten, so genannte *monocyte-derived iMDC*. Wie in der vorliegenden Arbeit wurden die zwei so gewonnenen Zelltypen mit Monozyten hinsichtlich ihrer Expression der TLRs verglichen.

Als Resultat zeigte sich ebenfalls, dass die PDC, bzw. *plasmacytoid pre-DC* TLR1, TLR7 und TLR9 exprimiert, die *monocyte-derived iMDC* jedoch nur TLR1, TLR2, TLR3, TLR5 und TLR6 sowie schwach TLR8 und TLR10. Die zum Vergleich herangezogenen Monozyten zeigten ein ähnliches Expressionsmuster der TLRs wie in dieser Arbeit dargestellt, nämlich, dass eine Expression der TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR8 gefunden werden konnte, zum Teil jedoch nur sehr schwach.

Die exklusive Expression von TLR9 sowie der Mangel an TLR4 in humanen dendritischen Zellen auf PDC konnte bestätigt werden, die Expression von TLR4 auf *monocyte-derived iMDC* konnte von Kadowaki *et al.* jedoch nicht nachgewiesen werden. Es ist denkbar, dass die durch magnetische Selektion isolierten Zellen in dieser Arbeit einen unreiferen Differenzierungsgrad besitzen als die durch Ausreifung von Monozyten gewonnenen und dadurch eine andere TLR-Expression aufweisen. Kadowaki *et al.* zeigen, dass mit der Ausreifung die Expression der TLRs unabhängig von der Zellpopulation zum Teil dramatisch zurückgeht. So beobachteten sie, dass durch die Ausreifung von Monozyten zuerst zu *monocyte-derived iMDC* und anschließend zu *mature DC1* die Expression von TLR4 nahezu komplett zurückging.

Die Arbeitsgruppe um Lanzavecchia untersuchte ebenfalls die beiden Subpopulationen dendritischer Zellen im peripheren Blut im Hinblick auf die Ausstattung mit TLRs und die Reagibilität auf verschiedene mikrobielle Stimuli. Sie konnten mittels PCR feststellen, dass PDC die TLRs 7 und 9 exprimieren und MDC reziprok dazu die TLRs 2, 3, 4, 5, 6 und 8⁸⁰.

Eine weiter führende quantitative Analyse der Expression der TLRs 1-10 auf verschiedenen zellulären Subpopulationen wurde durch Hornung *et al.* in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt⁴⁸. Er konnte ebenfalls nachweisen, dass in PDC, die nach dem gleichen Protokoll wie in der vorliegenden Arbeit isoliert worden waren, nur die TLRs 1, 7 und 9 sowie geringe Mengen der TLRs 6 und 10 nachweisbar waren. In Monozyten konnten die TLRs 1, 2, 4, 5, 6, 8 und 9 sowie gering gradig TLR7 gefunden werden. Dies bestätigt die Ergebnisse, die mit der qualitativen PCR in dieser Arbeit erhoben wurden.

4.2.2 Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen durch CpG-Oligonukleotide

Die Aktivierung plasmazytoider dendritischer Zellen durch CpG Oligonukleotide wurde von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Bauer *et al.* haben in ihrer Arbeit⁴¹ eine Aktivierung von aufgereinigten PDC durch ODN 2006, nicht jedoch durch LPS anhand der Hochregulation von CD86 und CD40 feststellen können. Sie konnten auch eine Verbesserung des Überlebens von PDC durch ODN 2006 sehen, die wie in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von IL-3 übertraf.

Wiederum die Arbeitsgruppe von Kadowaki verwendete ebenfalls das ODN 2006, aber auch andere CpG-Oligonukleotide, deren Sequenzen zum Teil Palindrome enthielten, zur

Stimulation von plasmazytoiden dendritischen Zellen⁵⁵. Sie konnten gleichfalls eine starke Verbesserung des Überlebens von PDC durch ODN 2006 feststellen, aber auch die anderen CpG-ODN zeigten einen ähnlichen, wenn auch etwas schwächeren Effekt. In der Untersuchung der Aktivierungsmarker CD80 und CD86 gelangten sie zu einem ähnlichen Ergebnis. ODN 2006 war wie in der vorliegenden Arbeit der beste untersuchte Stimulus für aufgereinigte PDC, die anderen CpG-ODN konnten keine vergleichbar starke Stimulation hervorrufen.

Zwar nicht in aufgereinigten Zellen, aber zumindest in einer angereicherten Population plasmazytoider dendritischer Zellen haben auch Krug und Kollegen die Expression von CD80, CD86 und HLA-DR nach Stimulation mit ODN 2006 bzw. ODN 2216 untersucht⁷⁹. Das Ergebnis bestätigt die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde. Auch die Tatsache, dass PDC auf Stimulation mit ODN 2006 stärker und vor allem schneller reagieren als auf Stimulation mit ODN 2216, wird in dieser Publikation bestätigt.

4.2.3 Aktivierung myeloider dendritischer Zellen durch Lipopolysaccharid

Jarrossay *et al.* haben in ihrer Arbeit nach dem MACS-Prinzip aufgereinigte MDC mit verschiedenen Stimuli inkubiert, wobei nur bei Stimulation mit LPS eine Aktivierung der Zellen anhand Hochregulation von CD80, CD83 und CD86 zu erkennen war. Auf CpG-ODN reagierten die MDC nicht, was sich mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit deckt.

Der Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen wird erschwert durch die Verwendung unterschiedlicher Protokolle zur Isolierung CD11c⁺ dendritischer Zellen. So werden zumeist Monozyten, die mit der MACS Technik oder durch Adhäsion aufgereinigt wurden, mit GMCSF und IL-4 zu dendritischen Zellen ausgereift. Dieser Unterschied in der experimentellen Vorgehensweise mindert die Aussagekraft eines Vergleiches der Ergebnisse. Bauer *et al.* zeigten jedoch in ihrer Arbeit⁴¹, dass auch Monozyten-abgeleitete dendritische Zellen, die CD11c⁺ waren, nicht durch das von ihnen verwendete ODN 2006, aber durch LPS zu aktivieren waren. Sie konnten durch FACS-Analyse feststellen, dass CD40, CD86 und HLA-DR nach Stimulation mit LPS hochreguliert wurden, was den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnissen entspricht.

4.2.4 Zytokinproduktion plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen

Die Zytokinproduktion plasmazytoider dendritischer Zellen wurde ebenfalls in den bereits zum Vergleich herangezogenen Arbeiten untersucht. So konnte Krug in ihrer Arbeit ⁷⁹ in durchflusszytometrischen Untersuchungen nachweisen, dass es ausschließlich die CD123+ HLA-DR+ dendritischen Zellen waren, die nach Stimulation mit CpG-ODN IFN- α produzierten. In dieser Arbeit konnte weiterhin mit ODN 2216 das Oligonukleotid mit der bisher höchsten stimulatorischen Kapazität zur Induktion von IFN- α identifiziert werden. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurden von Krug jedoch nur angereicherte Populationen von PDC verwendet, was wiederum erklärt, dass anders als in der vorliegenden Arbeit kein IFN- α nach Stimulation mit ODN 2006 detektiert werden konnte.

Kadowaki *et al.* ⁸¹ untersuchten mehrere Zytokine in aufgereinigten PDC. In PDC konnte nur durch CpG-ODN eine IFN- α Produktion hervorgerufen werden, die anderen verwendeten Stimuli wie z.B. LPS oder Peptidoglykan führten zu keiner messbaren Produktion der untersuchten Zytokine. Das verwendete CpG-ODN AAC-30 (Sequenz: acc gat acc ggt gcc gg tga cgg cac ca cg, Phosphodiester) führte in PDC zu einer starken IFN- α Produktion. IL-12, von dem nur die bioaktive Form gemessen wurde, war nie über der unteren Schwelle des Messbereiches.

Bauer *et al.* konnten ebenfalls in PDC durch ODN 2006 oder DNA von *Escherichia coli* die Produktion von IFN- α stimulieren, nicht jedoch durch LPS. Nach eigenen Beobachtungen ist jedoch die Kapazität zur IFN- α Produktion von PDC, die wie bei Bauer *et al.* aus Tonsillen isoliert wurden, eingeschränkt.

Jarrossay und Kollegen stellen in ihrer Arbeit dar, dass ODN 2216, nicht jedoch ODN 2006 in PDC zu einer IFN- α Produktion führt. Stimulation mit LPS zeigte keine Produktion von IFN- α und IL-12 in PDC. Weiterhin machten sie die Beobachtung, dass ODN 2006 in PDC mehr IL-12 als ODN 2216 induziert. Wie in der vorliegenden Arbeit untersuchten sie auch die Kinetik der Produktion von IFN- α und stellten dabei fest, dass nach Stimulation mit dem Influenzavirus die Hauptmenge IFN- α von PDC im Zeitraum zwischen 12 und 24 Stunden produziert wird ⁸⁰. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellte hohe IL-12 und IFN- α Produktion durch PDC nach synergistischer Stimulation mit CpG-ODN und CD40 Ligand wurde bisher in keiner veröffentlichten Arbeit bestätigt.

Die Zytokinproduktion myeloider dendritischer Zellen unterliegt wie die Aktivierung myeloider dendritischer Zellen aus bereits erwähnten Gründen leider einer nur eingeschränkten Vergleichbarkeit. Wiederum nur die Arbeitsgruppe um Jarrossay verwendete die gleiche Isolationsmethode für MDC und machte übereinstimmend mit der vorliegenden Arbeit die Beobachtung, dass diese Zellen auf Stimulation mit LPS IL-12, aber kein IFN- α produzierten. Ebenfalls bestätigen konnten sie eine IL-12-Produktion nach Stimulation mit CD40 Ligand ⁸⁰.

Die Arbeitsgruppen von Kadowaki und Bauer verwendeten mit GMCSF und IL-4 ausgereifte Monozyten in ihren Experimenten ^{41, 81}. Beide konnten nur nach Stimulation mit LPS, nicht jedoch CpG-ODN eine geringfügige Produktion von IL-12 messen, darunter geringe Mengen bioaktives IL-12.

4.2.5 Gesteigerte Expression von Chemokin-Rezeptoren auf plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Stimulation mit ODN 2006

Die Expression der Chemokin-Rezeptoren auf PDC wurde von der von Antonio Lanzavecchia geleiteten und bereits mehrmals zitierten Arbeitsgruppe untersucht. Sie fanden – konsistent mit den Ergebnissen dieser Arbeit – dass PDC nach Stimulation mit ODN 2216, vor allem aber mit ODN 2006 CCR7 verstärkt exprimiert. Sie beschreiben weiterhin eine verminderte Expression von CXCR3 nach Inkubation mit eben genannten Stimuli ⁸⁰.

4.2.6 Induktion einer Th1-gerichteten Immunantwort durch plasmazytoide dendritische Zellen

Zu Beginn der Arbeit an dendritischen Zellen im peripheren Blut wurde die Auffassung propagiert, dass unterschiedliche Subtypen von dendritischen Zellen bereits eine vorgegebene Richtung der Polarisierung in sich tragen. So ging man davon aus, dass – unabhängig von äußeren Umständen wie z.B. dem Zytokinmilieu – MDC naive allogene T-Zellen in Th1-Richtung primen würden, während PDC für die Th2-Polarisierung zuständig wären ⁷². Daraus ergab sich die zum Teil bis heute gebräuchliche, inzwischen allerdings nicht mehr hilfreiche, Bezeichnung dieser dendritischen Zellen als DC1 bzw. DC2.

Die Induktion einer Proliferation von naiven alloogenen T-Zellen durch PDC ist bereits mehrfach beschrieben worden^{41, 73}. Ob jedoch durch PDC eine Th1-gerichtete Immunantwort zu initiieren war, blieb strittig, da es unterschiedliche Angaben dazu gab, ob PDC in der Lage wären, IL-12 zu produzieren^{73, 82}. Zwar haben sowohl Cella als auch Kadowaki in ihren Veröffentlichungen durch mit dem *Herpes simplex Virus* stimulierte PDC in naiven alloogenen T-Zellen eine Th1-Polarisierung gesehen, doch waren beide nicht in der Lage, IL-12 direkt zu messen. Mit Hilfe von blockierenden Antikörpern gegen IFN Typ I war es Cella *et al.* gelungen, die Th1-Polarisierung durch PDC zu inhibieren. In der vorliegenden Arbeit wurde in einem ähnlichen Versuchsaufbau durch Blockierung von IL-12 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern der Beweis erbracht, dass PDC auch in der Lage sind, abhängig von IL-12, naive T-Zellen in Th1-Richtung zu polarisieren.

Man kann also davon ausgehen, dass es abhängig vom Reifegrad der PDC ist, welche Zytokine produziert werden. So wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass mit fortschreitender Ausreifung weniger IFN- α und mehr IL-12 von PDC produziert wird, was auch Cellas Beobachtungen erklärt. Jetzt konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass CpG-ODN (besonders ODN 2006) in Kombination mit CD40 Ligand als Stimulus PDC in die Lage versetzt, auch IL-12 vermittelt eine Th1-Polarisierung von naiven T-Zellen zu bewirken.

Die Zahl der regulatorischen T-Zellen hat einen großen Einfluss auf T-Zell induzierte Toleranz sowie die Verhinderung von Autoimmunerkrankungen, Organabstoßung nach Transplantationen sowie der *Graft-versus-host*-Erkrankung. Laut Gilliet *et al.* spielen PDC eine große Rolle in der Induktion von regulatorischen T-Zellen und sichern auf diese Weise die Toleranz von T-Zellen eigenem Gewebe gegenüber⁸³. In den durchgeführten Experimenten konnte ein Einfluss von CpG-ODN auf den Anteil der durch IL-10-Produktion charakterisierten regulatorischen T-Zellen nicht festgestellt werden und ließ sich dem entsprechend auch nicht durch blockierende Antikörper beeinflussen. Dies läßt vermuten, dass PDC auf einem Entwicklungsstand nach ca. zweieinhalbtägiger Ausreifung mit IL-3 nicht mehr zur Induktion von regulatorischen T-Zellen beitragen.

4.3 Bewertung der Ergebnisse

4.3.1 Die Ausstattung mit Toll-like Rezeptoren bestimmt die Sensitivität plasmazytoider und myeloider dendritischer Zellen auf verschiedene mikrobielle Moleküle

Mit der TLR-Familie hat das Immunsystem ein Instrument, mit dem sich, zum Teil durch Kombination der Rezeptoren, die Möglichkeit eröffnet, zwischen der großen Zahl der Pathogen-assoziierten Moleküle der Umwelt zu unterscheiden⁸⁴. Dendritische Zellen, die wegen ihrer Aufgabe als Initiatoren einer Immunantwort schnell und sicher zwischen ungefährlichen und gefährlichen Fremdmolekülen unterscheiden müssen, besitzen verschiedene TLRs^{85, 86}. Theoretisch wäre es sinnvoll, wenn verschiedene Typen von dendritischen Zellen unterschiedliche Subtypen von TLRs exprimieren würden. Dadurch wäre es ohne großen Zeitverlust möglich, die zur Bekämpfung des invadierenden Pathogens passende Immunantwort einzuleiten.

In der vorliegenden Arbeit wird dargestellt, dass dies für die zwei untersuchten Subtypen von dendritischen Zellen der Fall ist. Seit langem wird kontrovers diskutiert, ob diese von einer DC initiierte Immunantwort auf einen mikrobiellen Stimulus nun durch den PAMP-Stimulus und seinen Rezeptor selbst oder ihre *lineage*-Zugehörigkeit, d.h. durch in der Zelldifferenzierung festgelegte Stimulus-unabhängige Reaktionsmuster, determiniert ist.

Plasmazytoide und myeloide dendritische Zellen weisen fundamental verschiedene Expressionsmuster der TLRs auf. Vor allem die exklusive Expression von TLR9 als CpG-Rezeptor nur in PDC (neben der bekannten Expression in B-Zellen) ist von Bedeutung. TLR4 hingegen, der Rezeptor für LPS, wurde nur in MDC, nicht jedoch in PDC exprimiert. TLR3, der von der Arbeitsgruppe um Muzio noch für spezifisch für dendritische Zellen erklärt worden war⁸⁵, konnte nur in MDC nachgewiesen werden, nicht in PDC.

Diese Ergebnisse sowie eine Reihe weiterer funktioneller Untersuchungen stützen die Hypothese, dass die DC-*lineage* entscheidend die Antwort auf einen PAMP beeinflusst. So ließ sich in Stimulationsexperimenten primärer MDC mit TLR4-Agonisten eine deutliche Induktion von IL-12 erreichen, während PDC auf TLR9-Aktivierung große Mengen an IFN Typ I produzierten^{81, 87}. Da die korrespondierenden TLRs jedoch komplementär auf diesen Zelltypen verteilt sind, war auf Grund dieser Beobachtungen

keine abschließende Beantwortung der Frage *lineage* oder *PAMP*-spezifisch möglich. So war durch diese Daten nicht ausgeschlossen, dass die Expression eines bestimmten PRRs und damit sein spezifischer Agonist den Ausgang einer Immunantwort bestimmt.

TLR7 nimmt unter den PRRs eine Sonderstellung ein, da im humanen System sowohl MDC als auch PDC diesen Rezeptor exprimieren. Auf diese Weise war es möglich, durch eine Stimulation dieses TLRs mit seinem spezifischen Liganden zu testen, ob die hervorgerufene Immunantwort durch den Stimulus selbst oder die den Rezeptor tragende Zielzelle bestimmt wird. Ito *et al.* konnten entscheidende Hinweise liefern, dass in der Tat eher die *lineage*-Zugehörigkeit der stimulierten Zelle die darauf folgende Immunantwort bestimmt. Der TLR7-Agonist R-848 steigerte zwar sowohl das Überleben als auch die kostimulatorische Fähigkeit von MDC und PDC, allerdings bestanden deutliche Unterschiede in den evozierten Zytokinen. In PDC induzierte R-848 selektiv IFN Typ I, während MDC spezifisch zur Produktion von IL-12 angeregt wurden ⁸⁷.

Für CpG-DNA lassen sich diese Beobachtungen zusätzlich zumindest auf das murine System ausweiten, da hier nicht nur PDC und B-Zellen TLR9 exprimieren, sondern auch APCs myeloider Herkunft ⁸⁸. Wie im humanen System bei dem TLR7-Agonisten R-848 beobachtet, induziert CpG in murinen MDC IL-12 und in murinen PDC IFN Typ I. Somit wird auch durch diese Beobachtung wiederum die Hypothese untermauert, dass nicht der PAMP-Stimulus bzw. der korrespondierende TLR selbst, sondern die stimulierte Zelle über den Ausgang der Immunantwort entscheidet.

4.3.2 Die plasmazytoide dendritische Zelle ist zentral für die Erkennung von CpG-ODN

Ursprünglich war man der Ansicht, dass humane Monozyten, NK-Zellen und T-Zellen in der Lage sind, CpG-ODN zu erkennen. Diese Annahme wurde jedoch bald angezweifelt, als Untersuchungen an isolierten Zellpopulationen möglich wurden. Durch die Entdeckung der TLRs richtete sich der Blick auf diese PRRs als mögliche Mittler eines CpG-Effekts. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Expression von TLR9 in humanen dendritischen Zellen nachgewiesen. Inzwischen ist nach quantitativen Untersuchungen an aufgereinigten Zellpopulationen klar, dass nur PDC und B-Zellen direkt empfindlich für CpG-ODN sind, da nur diese beiden Zelltypen den zur Erkennung von CpG-ODN benötigten TLR9 besitzen ⁴⁸.

Andere Zellpopulationen exprimieren gar keinen oder zu wenig TLR9, als dass dies funktionelle Konsequenzen hätte. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass Monozyten TLR9 im Lauf ihrer Differenzierung oder als Reaktion auf Stimulation durch bestimmte Zytokine oder mikrobielle Moleküle hochregulieren könnten, wahrscheinlicher ist jedoch, dass manche aufgereinigte Zellpopulation in bisherigen Studien durch geringe Mengen von PDC, die allerdings zur Aktivierung durch CpG-ODN ausreichen, auf Grund unzuverlässiger Isolationsmethoden verunreinigt waren.

Die Expression von TLR9 ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Erkennung von CpG-ODN. CpG-ODN hat auf die hochspezialisierte B-Zelle einige bereits in der Einleitung erwähnte Effekte und bedingt weiterhin in der PDC als Reifestimulus eine morphologische und funktionelle Entwicklung zu einer dendritischen Zelle.

Beobachtungen im humanen und murinen System belegen, dass für die Maus wie den Menschen die Expression von TLR9 zur Erkennung von CpG-DNA notwendig ist ^{7, 22}. In PDC führt CpG-ODN – vermittelt durch TLR9 – unter anderem zu einer hohen Produktion von IFN- α ²³, durch das auch andere, primär auf CpG-DNA unresponsive Zellen stimuliert werden. Daher ist die PDC notwendig zur Erkennung von CpG-Motiven, anhand derer das humane Immunsystem bakterielle und virale DNA identifiziert und ist essenziell für die Vermittlung ihrer immunstimulatorischen Effekte.

Interessanterweise reagierten MDC auf CpG-ODN, wenn der Versuchsansatz auch PDC enthält. Dies weist darauf hin, dass MDC durch Zytokine, die von PDC nach Stimulation durch CpG-ODN sezerniert werden, aktiviert werden können und unterstützt die Annahme, dass die PDC die zentrale Zelle in der Einleitung einer durch CpG-DNA hervorgerufenen Immunantwort darstellt.

In Mäusen besteht hier ein klarer Unterschied zum humanen System. Im Gegensatz zum Menschen besitzen murine Zellen der myeloiden Reihe wie Monozyten oder MDC TLR9 und reagieren daher direkt auf CpG-ODN ⁸⁹. Dies führt zu verschiedenen Zielzellen für CpG-ODN in Mäusen und Menschen und sollte bedacht werden, wenn Ergebnisse aus dem murinen in das humane System übertragen werden.

4.3.3 Die Rolle der plasmazytoiden dendritischen Zelle bei viraler Infektion

IFN- α spielt eine große Rolle in der Bekämpfung von Viren und intrazellulären Bakterien⁹⁰, indem es unter anderem in infizierten Zellen antivirale Mechanismen aktiviert, die IL-12 Produktion herabsetzt und die NK-Zell vermittelte Zellyse induziert⁹¹. Es wird im peripheren Blut bei viralen Infektionen fast ausschließlich von der PDC produziert⁷⁰, der konsequenter Weise eine wesentliche Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen zugeschrieben wird.

IFN- α ist zusammen mit IL-12 das wichtigste Zytokin in der Einleitung einer Th1-Antwort im humanen System nach viralen Infektionen⁹². Während bereits mehrfach veröffentlicht worden ist, dass PDC IFN- α produzieren können^{69, 73}, bestand Uneinigkeit darüber, ob PDC in der Lage sind, IL-12 zu sezernieren^{73, 82}. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch synergistische Stimulation mit CpG-ODN und CD40 Ligand PDC durchaus große Mengen an IL-12 produzieren können. Dabei konnte auch die bioaktive Form IL-12p70 detektiert werden.

Interessanter Weise verändert sich das Verhältnis von IFN- α und IL-12, das von PDC nach Stimulation mit CpG produziert wird, während die Zellen in Kultur mit IL-3 ausreifen. Je später PDC durch CpG (ODN 2006 sowie ODN 2216) stimuliert werden, desto weniger IFN- α und desto mehr IL-12 wird produziert. Die biologische Konsequenz aus dieser Beobachtung könnte sein, dass zu Beginn der Immunantwort durch die dominierende Produktion von IFN- α zunächst die Effektoren der angeborenen Immunität, wie zum Beispiel NK-Zellen und Monozyten, aktiviert werden⁹¹ sowie die Aktivierung und Proliferation von CD8⁺ Gedächtniszellen gefördert wird, es im folgenden jedoch durch die dominierende Produktion von IL-12 – inklusive der bioaktiven Unterform IL-12p70 – zu einer Unterstützung der Ausbildung einer Antigen-spezifischen T-Zell-Antwort kommt. Das zu dieser Ausreifung notwendige IL-3 wird unter anderem von Stromazellen, Monozyten bzw. Makrophagen sowie von aktivierten T-Zellen produziert⁹³. Auf diese Art können aktivierte T-Zellen die Entwicklung von PDC sowohl durch Expression von CD40 Ligand als auch durch Sekretion von IL-3 beeinflussen.

Die ebenfalls untersuchte Expression von Chemokin-Rezeptoren gibt weitere Hinweise auf Interaktionen von dendritischen Zellen mit T-Zellen. So werden in PDC CCR7 und IP-10 nach Stimulation mit CpG schnell hochreguliert, während die Ausprägung von CXCR3 auf dem konstitutiven Niveau verbleibt. Die unterschiedliche Geschwindigkeit der Reaktion

nach Stimulation mit CpG-A und CpG-B lässt sich wohl wiederum durch die bereits erwähnten verschiedenen Signaltransduktionswege der beiden untersuchten CpG-Oligodesoxynukleotide erklären. IP-10, ein Entzündungsmediator, rekrutiert Zellen, die CXCR3 auf ihrer Oberfläche besitzen, so z.B. T-Zellen und unstimulierte PDC, unter der Vermittlung von CXCR4 und CXCL12 an die Orte lokaler Entzündungen^{70, 94, 95}. CCR7 vermittelt die Wanderung von Immunzellen zu sekundären lymphatischen Organen wie z.B. Lymphknoten, indem CCR7 an SLC (*Secondary lymphoid-tissue chemokine*) oder ELC (*EBI-1-Ligand chemokine*), die in HEV und auf lymphatischen Endothelien exprimiert werden, bindet⁹⁶. Durch die Ausprägung von CCR7 auf ihrer Oberfläche werden PDC in die regionalen Lymphknoten drainiert und können dort in T-Zell-Regionen naive T-Zellen primen⁹⁷.

4.3.4 Die unterschiedlichen CpG-Typen

Es gibt auffällige Unterschiede zwischen den beiden CpG-Typen, nicht nur was die Wirkung auf PDC und B-Zellen betrifft. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PDC in der Lage sind, IL-12 und IFN Typ I in großen Mengen zu produzieren, wobei Unterschiede zwischen den untersuchten CpG-ODN deutlich wurden. CpG-A führt zu einer hohen IFN- α/β -Produktion in PDC, zeigt jedoch eine schwächere Aktivierung von B-Zellen als CpG-B. CpG-B stimulieren wiederum die Expression von Aktivierungsmarkern auf PDC stärker und rufen nach synergistischer Stimulation mit CD40 Ligand eine stärkere Produktion von IL-12 durch PDC hervor.

Dies lässt sich durch unterschiedliche Signaltransduktionswege für diese beiden CpG-ODN erklären⁵⁰. So induzieren Typ A ODN (z.B. ODN 2216) über einen längeren Zeitraum IFN Typ I, Typ B ODN (z.B. ODN 2006) hingegen führen zu einer stärkeren Hochregulation kostimulatorischer und Antigen-präsentierender Moleküle. Weiterhin aktiviert CpG-A im Gegensatz zu CpG-B die autokrine Interferon Typ I-Rezeptor (IFN-R) Rückkoppelungsschleife, die über IFN-R vermittelt wird. Dies deutet darauf hin, dass CpG-A und CpG-B unterschiedliche Signaltransduktionswege (abhängig bzw. unabhängig von IFN-R) aktivieren.

Es ist auch nicht überraschend, dass sich diese Unterschiede fortsetzen, wenn man die indirekte Erregung von Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen betrachtet. CpG-A (z.B. ODN 2216) induziert via IFN Typ I eine Antigen-unabhängige partielle Aktivierung von CD8⁺ Gedächtniszellen⁴⁸, die anhand von Versuchen mit T-Zell-Klonen herausgefunden wurde.

Sie aktivieren NK-Zellen, indem sie deren Produktion von IFN- γ und ihre lytische Aktivität steigern. Außerdem führen sie zu Proliferation von $\gamma\delta$ -Zellen, steigern deren IFN- γ -Produktion und deren lytische Aktivität ⁷⁸.

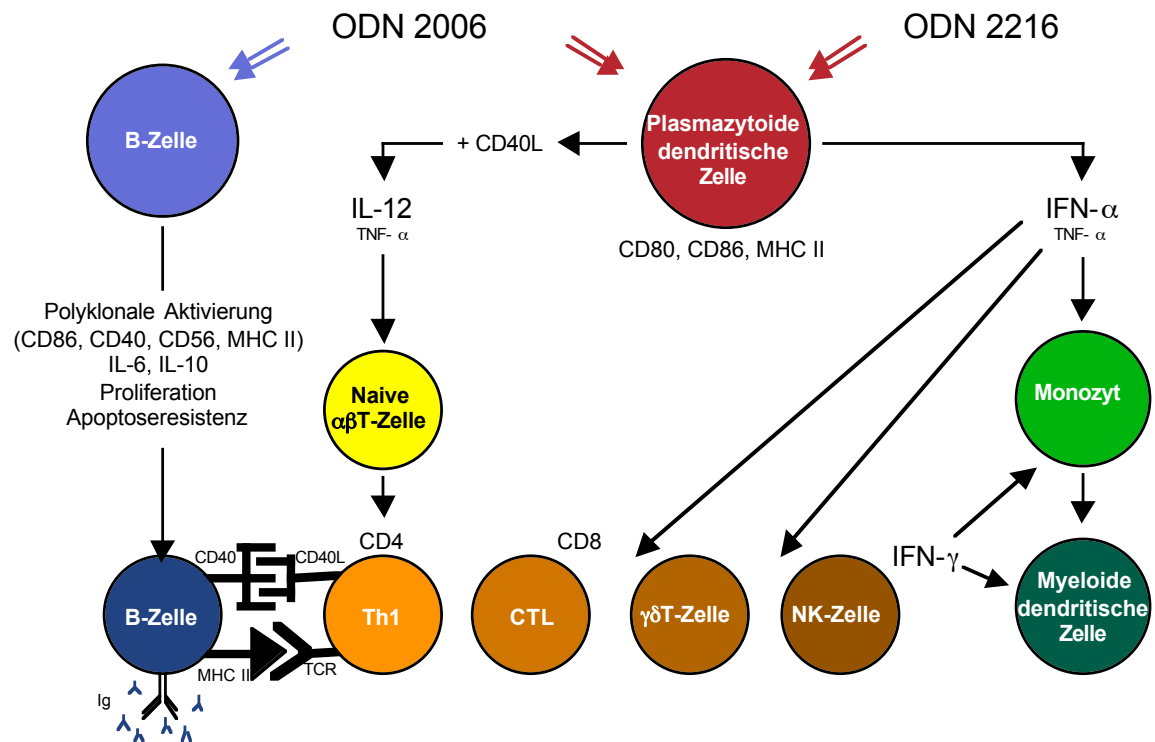


Abbildung 15: Wirkungen von CpG-ODN im humanen Immunsystem. B-Zellen und PDC werden direkt durch CpG-ODN aktiviert. Andere Immunzellen werden sekundär durch von PDC produzierte Zytokine (v.a. IL-12 und IFN- α) stimuliert. IL-12 fördert eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort mit zytotoxischen T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (Th1-Antwort). IFN- α aktiviert Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen. Zudem induziert IFN- α eine vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle auf Monozyten und MDC, die beide nicht direkt durch CpG-ODN stimulierbar sind. (nach Rothenfusser: Plasmacytoid dendritic cells: The key to CpG, Human Immunology 63, 1111-1119 (2002))

CpG-B hingegen sind schwächere Aktivatoren von NK- und $\gamma\delta$ -Zellen. Sie stimulieren B-Zellen und führen zu einer polyklonalen Aktivierung, Proliferation und Steigerung (bei synergistischer Ligation des B-Zell-Rezeptors) der Antikörperproduktion. Sowohl CpG-A als auch CpG-B erhöhen indirekt die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf Monozyten und MDC. Die zentrale Rolle der PDC in der Vermittlung der CpG-Effekte wird in Abbildung 15 dargestellt. Insgesamt kann man sagen, dass die plasmazytoide dendritische Zelle aufgrund ihrer Rezeptorausstattung und ihrer Fähigkeit zur Zytokinproduktion eine bedeutende regulatorische Rolle im humanen Immunsystem inne hat und der Schlüssel zu den unterschiedlichen Wirkprofilen der verschiedenen CpG-Oligodesoxynukleotide ist.

In einer kürzlich erschienenen Arbeit der Arbeitsgruppe um Hartmann wird eine CpG-Sequenz neuen Typs beschrieben, die sowohl große Mengen IFN Typ I in PDC induziert, als auch direkt B-Zellen aktiviert. Damit kombiniert sie die charakteristischen direkten Effekte beider bisher bekannten CpG-Typen. Indem es B-Zellen direkt und indirekt (über die PDC) stimuliert, ist dieses CpG-C genannte ODN ein potenterer Stimulator für B-Zellen als CpG-B⁵⁰.

4.3.5 PDC benötigen zur Produktion von bioaktivem IL-12 zwei Signale

Die These, dass die Induktion von bioaktivem IL-12 zweier Signale bedarf, beruht vor allem auf der Beobachtung, dass DC erst nach Stimulation durch mikrobielle Moleküle, die zu einer Hochregulierung von CD40 führten und damit erst die Ligation durch CD40 Ligand (CD154) möglich machen, IL-12p70 sezernierten. Man nimmt an, dass *in vitro* dieses zweite Signal durch mechanische Belastung der Zellen ersetzt werden kann⁹⁸. Das könnte als Erklärung dafür herangezogen werden, warum MDC in den vorgenommenen Experimenten eine spontane Aktivierung und Ausreifung zeigten, wie an den Oberflächenmarkern zu sehen, und warum sie nach Stimulation mit LPS oder CD40 Ligand alleine signifikante Mengen an IL-12 produzierten. PDC hingegen zeigten in der Zellkultur ohne Stimulation spontane Apoptose und keinerlei Aktivierung oder Ausreifung.

Durch das verwendete ODN 2006 konnten PDC vor der Apoptose bewahrt werden sowie die CD40-Expression deutlich gesteigert werden. Beide CpG-ODN, die in dieser Arbeit untersucht wurden, konnten – jedoch nur kombiniert mit CD40 Ligand – eine hohe Menge an IL-12p70 in PDC hervorrufen, wobei ODN 2006 hier der etwas bessere Stimulus war. Insgesamt bestätigte sich die Theorie, dass die IL-12-Produktion durch zwei unabhängige Mechanismen kontrolliert wird: Erstens die Anwesenheit eines exogenen mikrobiellen Stimulus (in diesem Fall CpG-ODN) und zweitens die CD40 Ligation, die endogen durch aktivierte T-Zellen vorgenommen wird.

Mit fortschreitender Reifung (eventuell auf dem Weg zum Lymphknoten) werden PDC – durch Steigerung der Ausprägung von CD40 – empfänglicher für CD154 und reagieren mit stärkerer Hochregulierung der Aktivierungsmarker auf CpG-Sequenzen. Die synergistische Stimulation durch ODN 2006 und CD40 Ligand könnte eine bakterielle Infektion und ein Aktivierungssignal von T-Zellen simulieren. Diese beiden Signale

veranlassen die PDC, eine Th1-Antwort via Sekretion von IL-12 einzuleiten, um mit CD4⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen das bakterielle Antigen zu bekämpfen.

4.3.6 Die T-Zell-Region im Lymphknoten als Ort der Interaktion

Im menschlichen Körper erkennt die PDC im Blut das Pathogen, kann aber erst nach Wanderung in die nächstgelegenen Lymphknoten, die durch Expression von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen vermittelt wird, dort in den T-Zell-Regionen das notwendige zweite Signal zur Produktion von IL-12 finden. Die dort sitzenden naiven CD4⁺ T-Zellen können die PDC via CD40 Ligation aktivieren und werden in einer Rückkoppellungsschleife mittels IL-12 zur Proliferation angeregt. Wenn die PDC nicht in der Lage ist, endogene oder exogene Antigene zu präsentieren, was momentan in der Literatur noch kontrovers diskutiert wird ⁹⁵, wäre dies ihre wichtigste Möglichkeit – neben einem eventuellen Zell-Zell-Kontakt – auf andere Zellen des Immunsystems Einfluss zu nehmen ⁹⁹.

Während man früher der Ansicht war, dass die PDC nur in der Lage ist, eine Th2-Antwort zu initiieren, da man sie nicht in der Lage glaubte, IL-12 zu produzieren, zeigt diese Arbeit, dass bisher nur der adäquate Stimulus für die PDC nicht verwendet wurde. Jetzt, da die Kombination von CpG-ODN und CD40 Ligation als adäquater Stimulus zur Produktion von IL-12 bekannt ist, kann für die plasmazytoide dendritische Zelle eine Rolle als Schaltstelle zwischen Th1 und Th2/Th0 -Reaktionen angenommen werden: Bei adäquater Stimulation (z.B. durch CpG-DNA) initiiert sie eine Th1-Antwort, bei Fehlen eines solchen Stimulus fördert die PDC eine unpolarisierte Th0- oder eine humorale Th2-Antwort.

4.4 Therapeutische Relevanz der Aktivierung des Immunsystems durch CpG

Therapeutische Strategien mit CpG-ODN leiten sich aus ihrer charakteristischen Immunbiologie ab. Die durch CpG-DNA-Stimulation bewirkte Aktivierung der angeborenen Immunität und die darauf folgende Th1-Polarisierung einer spezifischen Immunantwort lassen sich sowohl prophylaktisch in der Anwendung von CpG-ODN als Adjuvans bei Impfungen, als auch therapeutisch in der Immuntherapie von Infektionen, Tumoren und Allergien nützen. Als Einzelsubstanz sind CpG-ODN durch die Induktion einer Th1-Antwort (IFN- γ Produktion) sehr hilfreich bei der Prophylaxe und Therapie von Infektionen

mit intrazellulären Erregern (z.B. Leishmanien, Listerien) ^{100, 101} und wirken allergischen Reaktionen entgegen.

4.4.1 CpG in der Therapie von Infektionskrankheiten und als Vakzine-Adjuvans

Es ist seit der Einführung von Vakzinierungen von Interesse, die Reaktion auf die Impfung zu beschleunigen oder zu verstärken, sei es, um die Dosis des Impfstoffes zu verringern, sei es, um – wie z.B. bei der Hepatitis-Impfung – die Zahl der Impfungen zu reduzieren. Als potentes Vakzine-Adjuvans führt CpG als Zusatz zu herkömmlichen Vakzinen durch seine Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und die Förderung der Antikörperproduktion sowohl bei prophylaktischen als auch bei therapeutischen Impfungen zu einem schnelleren und effektiveren Impfschutz ^{102, 103}. In Versuchen mit Mäusen konnte festgestellt werden, dass durch Zugabe von CpG-ODN zu hitzeinaktivierten Leishmanien-Vakzinen eine lang anhaltende, auf CD8-Gedächtniszellen basierte Antwort und damit Schutz gegen Infektion gegen Leishmanien induziert werden konnte ¹⁰⁴. Dabei wiesen CpG-ODN trotz höherer immunstimulatorischer Aktivität eine wesentlich geringere Toxizität als CFA (*Freund's complete adjuvant*) auf.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass ODN 2006 als Vakzine-Adjuvans bei Primaten die Entwicklung einer humoralen Immunantwort fördert ^{45, 105}. In Versuchen mit Rhesus Macaquen – die auf dieselben CpG-Motive ansprechen wie das humane System – konnte kürzlich gezeigt werden, dass simultane Applikation von CpG-ODN mit einer Impfung gegen Leishmanien den Schutz der Rhesus-Macaquen gegen eine Hautinfektion mit Leishmanien verbesserte ¹⁰⁶. Diese Daten weisen daraufhin, dass CpG-ODN auch im Primaten eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort verstärken. Damit eröffnen sich vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten für CpG-ODN als Immunadjuvans bei Vakzinen, die einen T-Zell-vermittelten Schutz gegen intrazelluläre Erreger und Tumore bewirken sollen.

Erstaunlich ist in diesem Zusammenhang, dass es offensichtlich möglich ist, mit CpG-ODN eine postexpositionelle Prophylaxe gegen Prionenerkrankungen (z.B. bovine spongiforme Enzephalopathie und Creutzfeld-Jakob-Krankheit) erfolgreich durchzuführen ¹⁰⁷. Normalerweise kommt es bei diesen Erkrankungen zu keiner Stimulation des Immunsystems – möglicherweise bedingt durch das Fehlen von Nukleinsäuren. In einem murinen Modell gelang es, mit CpG-ODN das Überleben infizierter Tiere zu verlängern,

was die Autoren durch eine Stimulation von Zellen des angeborenen Immunsystems via TLR9 erklären.

Therapeutische Wirksamkeit zeigte CpG-ODN bei topischer Anwendung gegen genitale Infektion mit *Herpes-Simplex-Virus-2*¹⁰⁸. Da mit CpG-ODN behandelte Mäuse Immunität gegen Reinfektion mit HSV-2 besaßen, kann man davon ausgehen, dass zusätzlich zur Aktivierung der angeborenen Immunität auch die erworbene Immunantwort durch CpG-ODN gefördert wird. Ebenso konnte nach mukosaler Immunisierung mit inaktiviertem HIV und CpG-ODN eine Immunität gegen Exposition mit rekombiniertem Virus festgestellt werden¹⁰⁹. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CpG-ODN ein wirksames Mittel zur Induktion lokaler Immunität und zum Schutz gegen virale Infektion sein könnten.

Die gute Verträglichkeit von CpG-ODN im humanen Immunsystem im Vergleich zu anderen Adjuvantien, wie z.B. CFA, ist durch die selektive Aktivierung bestimmter Zielzellen (B-Zellen und PDC) und die fehlende direkte Aktivierung myeloider Zellen bedingt. Eine anhaltende Aktivierung von Makrophagen und anderen Vertretern der Makrophagen-Zellreihe (wie Monozyten, MDC) induziert die Produktion hoher Mengen an inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wodurch gewebstoxische Nebenwirkungen verursacht werden. Zusätzlich führen schlecht abbaubare Substanzen, wie das in CFA-Emulsion enthaltene Mineralöl, zu einer anhaltenden Aktivierung von Makrophagen und anderen APC, die Adjuvantien phagozytieren¹¹⁰. Wegen seiner unerwünschten Nebeneffekte ist heutzutage die Anwendung von CFA auch in Tierversuchen problematisch.

4.4.2 CpG in der Immuntherapie von Tumoren

Durch die CpG-abhängige Aktivierung unspezifischer Effektorzellen (NK-Zellen, Makrophagen) wird die Antikörper-abhängige Zytotoxizität verstärkt. Vielversprechende Anwendungen von CpG-ODN gibt es dementsprechend im Bereich der Immuntherapie von Tumoren. Das Immunsystem wird durch die Anwesenheit von CpG als Gefahrensignal permanent stimuliert und ist dadurch theoretisch in der Lage, Tumoren effektiver zu bekämpfen. Beeindruckende Ergebnisse brachte eine Untersuchung, in der Sfondrini und Kollegen zeigen konnten, dass CpG-ODN die Inzidenz und die Zahl der Tumoren pro Maus in transgenen weiblichen Mäusen, die spontan Mammakarzinome entwickeln, signifikant zurückging¹¹¹. Weiterhin wurde die Zahl der Lungenmetastasen verringert und das Wachstum von bereits bestehenden Tumoren nach systemischer

Applikation von CpG-ODN geringfügig verlangsamt. Bei peritumoraler Injektion jedoch konnte dieser Effekt noch deutlich gesteigert werden.

In einem murinen Kolontumor-Modell konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass peritumoral applizierte CpG-ODN zu einer Abstoßung des Tumors und darüber hinaus zu einer Immunität gegen eine erneute Exposition gegenüber dem gleichen Tumor führen, was die Induktion einer spezifischen „*Memory*“-Antwort impliziert ¹¹². Im Gegensatz zur Monotherapie mit peritumoralen Injektionen von CpG-ODN, mit der nur kleine Tumoren geheilt werden konnten, gelang es unserer Arbeitsgruppe mit einer kombinierten DC- und CpG-ODN-Immuntherapie, größere Tumoren, die einer Chemotherapie bereits nicht mehr zugänglich sind, zur Abheilung zu bringen ¹¹².

4.4.3 CpG-Therapie bei Allergien

Allergische Erkrankungen beruhen meist auf einer überschießenden Th2-Antwort des Immunsystems mit verstärkter Bildung von IL-4 und IL-5 sowie IgE-Antikörpern. CpG-ODN induzieren eine Th1-gerichtete Immunantwort, charakterisiert durch die Ausschüttung von IL-12, IFN- γ und IgG_{2a}. Diese überschießende Immunantwort vom Th2-Typ bei Allergien kann durch eine CpG-Therapie antagonisiert werden ¹¹³. So wurde in ersten Studien im Tiermodell bei *Asthma bronchiale* eine deutliche Abschwächung der allergischen Reaktion durch CpG-ODN als Einzelsubstanz gezeigt ¹¹⁴.

Bei der Desensibilisierung gegen spezifische Allergene können CpG-ODN als Adjuvans eine Th1-gewichtete Immunantwort bahnen und damit die Ausprägung der allergischen Reaktionen abschwächen ¹¹³. In diesem Zusammenhang sind auch Studien von Interesse, die zeigen, dass Kinder, die auf einem Bauernhof aufgewachsen sind und damit verhältnismäßig mehr Pathogene inokuliert haben, deutlich seltener an Allergien und Asthma leiden ¹¹⁵. Durch die geringe Induktion proinflammatorischer Zytokine lassen sich – trotz der ausgeprägten Wirkung als Immunadjuvans – die im Allgemeinen geringen Nebenwirkungen von CpG-ODN erklären. Vor allem beim Menschen ist die Toxizität vieler Immunadjuvantien für deren Einsatz begrenzend. In Studien an Primaten zeigte sich bereits, dass CpG-ODN bei einer starken immunstimulierenden Wirkung keine limitierenden Nebenwirkungen aufweisen ^{105, 116}. Durch die selektive Aktivierung zweier Zielzellen, der B-Zelle und der plasmazytoiden dendritischen Zelle, entsteht ein breites therapeutisches Fenster bei geringer Toxizität. Unter diesem Gesichtspunkt sind CpG-ODN anderen immunstimulatorischen Substanzen überlegen.

5 Zusammenfassung

Die beiden Pathogen-assoziierten molekularen Muster, CpG-Oligonukleotide, als Imitate bakterieller DNA, und LPS, sind in der Lage, das menschliche Immunsystem zu stimulieren. Vor Entdeckung der Toll-like Rezeptoren konnte nicht zwischen direkten und indirekten Effekten von CpG-Oligonukleotiden und LPS auf Zellen des menschlichen Immunsystems unterschieden werden. Durch die Entdeckung der Toll-like Rezeptoren und vor allem die Charakterisierung von TLR9 als Rezeptor für CpG und TLR4 als Rezeptor für LPS entstand die Möglichkeit, die Zielzellen von PAMPs an Hand der Expression der dazugehörigen Rezeptoren zu definieren.

Dendritische Zellen sind im Immunsystem des Menschen essenziell für die Auslösung einer Immunantwort. Sie sind in der Lage, eindringende Pathogene an Hand von PAMPs schnell und sicher zu erkennen, und daraufhin eine passende Immunantwort zu initiieren. Zwei Subpopulationen von dendritischen Zellen konnten kürzlich im peripheren Blut identifiziert werden: Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) und myeloide dendritische Zellen (MDC).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Unterschiede zwischen PDC und MDC in ihren Reaktionen auf CpG-Oligonukleotide, LPS und CD40 Ligand charakterisiert. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass nur PDC und nicht MDC direkte Zielzellen von CpG-ODN im humanen Immunsystem darstellen, während LPS MDC aktiviert, jedoch nicht PDC. Damit konsistent konnte auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen werden, dass PDC TLR9 exprimieren, jedoch nicht TLR4, während MDC den für die Erkennung von LPS notwendigen Rezeptor TLR4 besitzen, aber TLR9 nicht exprimieren. In gemischten Populationen reagierten auch myeloide dendritische Zellen auf CpG-Oligodesoxynukleotide, was auf eine indirekte Aktivierung durch plasmazytoide dendritische Zellen hinweist.

PDC reagierten nach Stimulation mit ODN 2006 mit einer Hochregulation von Reifemarkern und kostimulatorischer Moleküle, der Expression von Chemokinrezeptoren, der Produktion proinflammatorischer Chemokine und einer verminderten Apoptoserate. Nach Stimulation mit ODN 2216 sezernierten sie große Mengen IFN- α , während ODN 2006 für die Induktion von IFN- α eine Kostimulation mit CD40 Ligand benötigte. Weder ODN 2006, ODN 2216 oder CD40 Ligand alleine waren in der Lage, IL-12 in PDC zu

induzieren, die synergistische Stimulation von PDC mit CpG-ODN und CD40 Ligand führen jedoch zur Produktion großer Mengen an IL-12.

Unter optimaler Stimulation mit ODN 2006 und CD40 Ligand können PDC damit gleichzeitig IL-12 und IFN- α produzieren. Das Verhältnis der produzierten Zytokine ist dabei abhängig vom Differenzierungsgrad der PDC. Durch zunehmende Ausreifung der PDC mit IL-3 verschiebt sich nach der Stimulation das Produktionsverhältnis an sezernierten Zytokinen zugunsten von IL-12. Ausreifung mit ODN 2006 ermöglicht PDC, zudem naive allogene CD4 Zellen zu aktivieren, und induziert in Kokulturen IL-12-abhängig ein Th1-gerichtetes Zytokinprofil in den CD4 T-Zellen. IFN- α schien dabei eine geringe Rolle zu spielen.

Durch die Charakterisierung der PDC als TLR9-tragende Zielzelle für CpG-DNA, trägt diese Arbeit entscheidend dazu bei, die PDC als Schlüsselzelle für die physiologischen Wirkungen von TLR9-Liganden zu identifizieren und zu verstehen. Dies ist von hoher Relevanz für die Entwicklung therapeutischer Anwendungen von CpG-ODN in der Tumorthherapie, Asthmabehandlung, Infektionsprophylaxe und als Adjuvans bei Impfungen.

6 Literaturverzeichnis

1. Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
2. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123-8.
3. Barton GM, Medzhitov R. Toll-like receptors and their ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2002; 270:81-92.
4. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999; 284:1313-8.
5. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996; 86:973-83.
6. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.
7. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.
8. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:13766-71.
9. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:14459-63.
10. Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; 413:732-8.
11. Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science* 1998; 282:2085-8.
12. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000; 1:398-401.
13. Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 2000; 164:558-61.
14. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002; 195:99-111.
15. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001; 276:10229-33.
16. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001; 410:1099-103.
17. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, et al. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 2002; 3:196-200.
18. Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 2002; 3:499.
19. Qureshi ST, Lariviere L, Leveque G, et al. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr4*). *J Exp Med* 1999; 189:615-25.
20. Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, et al. TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000; 25:187-91.
21. Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189:1777-82.

22. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:9237-42.
23. Wagner H. Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity* 2001; 14:499-502.
24. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:588-93.
25. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003; 278:38105-8. Epub 2003 Jul 30.
26. Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:5688-94.
27. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001; 167:5887-94.
28. Yamamoto M, Sato S, Mori K, et al. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002; 169:6668-72.
29. Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003; 4:161-7.
30. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002; 420:329-33.
31. Sharma S, tenOever BR, Grandvaux N, Zhou GP, Lin R, Hiscott J. Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003; 300:1148-51. Epub 2003 Apr 17.
32. Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res* 1999; 59:5429-32.
33. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther* 1994; 64:529-64.
34. Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72:955-62.
35. Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, et al. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 1992; 36:983-97.
36. Yamamoto T, Yamamoto S, Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T. Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Jpn J Cancer Res* 1994; 85:775-9.
37. Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995; 374:546-9.
38. Vollmer J, Janosch A, Laucht M, Ballas ZK, Schetter C, Krieg AM. Highly immunostimulatory CpG-free oligodeoxynucleotides for activation of human leukocytes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2002; 12:165-75.
39. Yu D, Zhu FG, Bhagat L, et al. Potent CpG oligonucleotides containing phosphodiester linkages: in vitro and in vivo immunostimulatory properties. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297:83-90.
40. Hartmann G, Weiner G, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9305-9310.
41. Bauer M, Redecke V, Ellwart JW, et al. Bacterial CpG-DNA triggers activation and maturation of human CD11c-, CD123+ dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:5000-7.

42. Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-37.
43. Palucka K, Banchereau J. Linking innate and adaptive immunity. *Nat Med* 1999; 5:868-70.
44. Krieg AM, Hartmann G, Yi AK. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 247:1-21.
45. Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary cells. *J Immunol* 2000; 164:944-952.
46. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med* 2000; 192:595-600.
47. Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 164:1617-1624.
48. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168:4531-7.
49. Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002; 71:813-20.
50. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- α induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33:1633-41.
51. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-62.
52. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193:233-8.
53. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:4-9.
54. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 1999; 5:1249-55. Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.
55. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194:863-9.
56. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 2001; 106:255-8.
57. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 82:487-93.
58. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29:2769-78.
59. Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH. Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000; 192:1775-84.
60. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
61. Lennert K, Kaiserling E, Muller-Hermelink HK. Letter: T-associated plasma-cells. *Lancet* 1975; 1:1031-2.

62. Papadimitriou CS, Stephanaki-Nikou SN, Malamou-Mitsi VD. Comparative immunostaining of T-associated plasma cells and other lymph- node cells in paraffin sections. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1983; 43:31-6.
63. Feller AC, Parwaresch MR, Wacker HH, Radzun HJ, Lennert K. Combined immunohistochemical staining for surface IgD and T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies in human tonsils. *Histochem J* 1983; 15:557-62.
64. Beiske K, Langholm R, Godal T, Marton PF. T-zone lymphoma with predominance of 'plasmacytoid T-cells' associated with myelomonocytic leukaemia--a distinct clinicopathological entity. *J Pathol* 1986; 150:247-55.
65. Facchetti F, De Wolf-Peeters C, van den Oord JJ, De vos R, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells: a cell population normally present in the reactive lymph node. An immunohistochemical and electronmicroscopic study. *Hum Pathol* 1988; 19:1085-92.
66. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165:6037-46.
67. Fitzgerald-Bocarsly P. Human natural interferon-alpha producing cells. *Pharmacol Ther* 1993; 60:39-62.
68. Svensson H, Johannisson A, Nikkila T, Alm GV, Cederblad B. The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry. *Scand J Immunol* 1996; 44:164-72.
69. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-7.
70. Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999; 5:919-23.
71. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:2154-63.
72. Risoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283:1183-6.
73. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* 2000; 1:305-310.
74. Tanaka H, Demeure CE, Rubio M, Delespesse G, Sarfati M. Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *J Exp Med* 2000; 192:405-12.
75. Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196:137-51.
76. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997; 90:1458-70.
77. Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-67. Epub 2001 Oct 4.
78. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, et al. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. *Eur J Immunol* 2001; 31:3525-34.
79. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. A new CpG oligonucleotide sequence induces maximal production of IFN- α in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3026-37.

80. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31:3388-93.
81. Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded rna, respectively, stimulate CD11c(-) type 2 dendritic cell precursors and CD11c(+) dendritic cells to produce type I IFN. *J Immunol* 2001; 166:2291-5.
82. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000; 192:219-26.
83. Gilliet M, Liu YJ. Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells. *Hum Immunol* 2002; 63:1149-55.
84. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406:782-7.
85. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000; 164:5998-6004.
86. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:249-55.
87. Ito T, Amakawa R, Fukuhara S. Roles of toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Hum Immunol* 2002; 63:1120-5.
88. Hochrein H, O'Keeffe M, Wagner H. Human and mouse plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002; 63:1103-10.
89. An H, Yu Y, Zhang M, et al. Involvement of ERK, p38 and NF-kappaB signal transduction in regulation of TLR2, TLR4 and TLR9 gene expression induced by lipopolysaccharide in mouse dendritic cells. *Immunology* 2002; 106:38-45.
90. Kaukoranta-Tolvanen SS, Teppo AM, Laitinen K, Saikku P, Linnavuori K, Leinonen M. Growth of *Chlamydia pneumoniae* in cultured human peripheral blood mononuclear cells and induction of a cytokine response. *Microb Pathog* 1996; 21:215-21.
91. Biron CA. Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections. *Semin Immunol* 1998; 10:383-90.
92. Cousens LP, Peterson R, Hsu S, et al. Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection. *J Exp Med* 1999; 189:1315-28.
93. Mangi MH, Newland AC. Interleukin-3 in hematology and oncology: current state of knowledge and future directions. *Cytokines Cell Mol Ther* 1999; 5:87-95.
94. Loetscher M, Loetscher P, Brass N, Meese E, Moser B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization. *Eur J Immunol* 1998; 28:3696-705.
95. Krug A, Uppaluri R, Facchetti F, et al. IFN-producing cells respond to CXCR3 ligands in the presence of CXCL12 and secrete inflammatory chemokines upon activation. *J Immunol* 2002; 169:6079-83.
96. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev* 2000; 177:134-40.
97. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-12.
98. Schulz O, Edwards DA, Schito M, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000; 13:453-62.

99. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG(1). *Hum Immunol* 2002; 63:1111-9.
100. Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, et al. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol* 1998; 160:3627-30.
101. Krieg AM, Love-Homan L, Yi AK, Harty JT. CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 1998; 161:2428-34.
102. Kovarik J, Bozzotti P, Love-Homan L, et al. CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses to vaccines but may fail to fully redirect Th2 responses established by neonatal priming. *J Immunol* 1999; 162:1611-7.
103. Brazolot Millan CL, Weeratna R, Krieg AM, Siegrist CA, Davis HL. CpG DNA can induce strong Th1 humoral and cell-mediated immune responses against hepatitis B surface antigen in young mice. *PNAS* 1998; 95:15553-8.
104. Rhee EG, Mendez S, Shah JA, et al. Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against leishmania major infection. *J Exp Med* 2002; 195:1565-73.
105. Jones TR, Obaldia N, 3rd, Gramzinski RA, et al. Synthetic oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance immunogenicity of a peptide malaria vaccine in Aotus monkeys. *Vaccine* 1999; 17:3065-71.
106. Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM. CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol* 2002; 168:1659-63.
107. Sethi S, Lipford G, Wagner H, Kretzschmar H. Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 2002; 360:229-30.
108. Harandi AM, Eriksson K, Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J Virol* 2003; 77:953-62.
109. Dumais N, Patrick A, Moss RB, Davis HL, Rosenthal KL. Mucosal immunization with inactivated human immunodeficiency virus plus CpG oligodeoxynucleotides induces genital immune responses and protection against intravaginal challenge. *J Infect Dis* 2002; 186:1098-105.
110. Hamilton JA. Nondisposable materials, chronic inflammation, and adjuvant action. *J Leukoc Biol* 2003; 73:702-12.
111. Sfondrini L, Besusso D, Rumio C, Rodolfo M, Menard S, Balsari A. Prevention of spontaneous mammary adenocarcinoma in HER-2/neu transgenic mice by foreign DNA. *Faseb J* 2002; 16:1749-54.
112. Heckelsmiller K, Beck S, Rall K, et al. Combined dendritic cell- and CpG oligonucleotide-based immune therapy cures large murine tumors that resist chemotherapy. *Eur J Immunol* 2002; 32:3235-45.
113. Parronchi P, Brugnolo F, Annunziato F, et al. Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 1999; 163:5946-53.
114. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160:2555-9.
115. Von Ehrenstein OS VME, Illi S, Baumann S, Bohm O, von Kries R. Reduced risk of hay fever and asthma among children of farmers. *Clin Exp Allergy* 2000; 30:187-193.
116. Davis HL, Suparto, II, Weeratna RR, et al. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 2000; 18:1920-1924.

7 Abkürzungen

ADCC	<i>Antibody-dependent cytotoxicity</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophyocyanin
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BHK	<i>Baby hamster kidney</i>
CCR7	CC Chemokin Rezeptor 7
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand-transfizierte Fibroblastenzelllinie
CFA	<i>Freund's complete adjuvant</i>
CFSE	5-(und -6-) Carboxyfluorescein Diacetat Succimidyl Ester
CpG	Cytidin-Guanosin-Dinukleotid
CO ₂	Kohlendioxid
CXCR3	G-Protein-gekoppelter Rezeptor für die CXC Chemokine IP-10 und MIG
DC	Dendritische Zelle
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dsRNA	<i>Double-stranded ribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELC	EBI-1-Ligand Chemokin
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCA	<i>Freund's complete adjuvant</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GMCSF	<i>Granulocyte monocyte colony stimulating factor</i>
HEV	<i>High endothelial venules</i>
HIV	Humanes Immunodefizienz-Virus
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HSV	<i>Herpes simplex virus</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN	Interferon
IFN-R	Interferon-Rezeptor
IRF	<i>Interferon regulatory factors</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ILT	<i>Immunglobuline-like transcripts</i>
IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i>
IP-10	<i>Interferon-γ inducible protein 10</i>
JIF	<i>Journal impact factor</i>
kDA	Kilodalton
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
Lin	<i>Lineage</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>

MAPK	Motogen-aktivierte Proteinkinasen
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NIPC	<i>Natural interferon producing cells</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NU	<i>Neutralizing Units</i>
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxynukleotid
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
pg	Pikogramm
PMA	Phorbol-12-mystritat-13-acetat
PO	Phosphodiester
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
PTZ	Plasmazytoide T-Zelle
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rt-PCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
SEM	<i>Standard error of mean</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid-tissue chemokine</i>
Th1	<i>T helper cell type 1</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α

8 Danksagung

Zu großem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. Stefan Endres für die Aufnahme in seine Abteilung, die angenehme Atmosphäre bei der Arbeit und für die Möglichkeit zum Besuch internationaler Kongresse verpflichtet.

Bei Herrn PD Dr. Gunther Hartmann bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die damit verbundene Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe forschen zu können sowie die nicht enden wollenden Ideen für neue Experimente.

Frau Dr. Anne Krug und Herrn Dr. Simon Rothenfusser möchte ich für die Einführung in die Arbeitstechniken der Immunologie, die fachlich hervorragende und menschlich überaus angenehme Betreuung sowie die große Unterstützung und Geduld in Phasen, in denen es nicht so gut lief, sehr herzlich danken.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Robert Bals für das Einlernen in die PCR-Technik, Thomas Giese und Hartmut Engelmann für die Hilfe bei der *real time*-PCR und vor allem Rosemarie Kiefl für schnelle Hilfe in allen Notsituationen im Labor.

Großer Dank gilt auch all meinen Mitstreitern im Labor: Den anderen Betreuern, insbesondere Herrn Dr. Marc Dauer und Herrn Dr. Max Schnurr, sowie den anderen Doktoranden, hier vor allem Frau Stefanie Britsch, Herrn Julian Röbe und natürlich ganz besonders Herrn Dr. Veit Hornung, der mich in die Arbeitsgruppe einführte. Ohne sie hätte diese Arbeit bei weitem nicht so viel Spaß gemacht.

Schließlich möchte ich auch noch Frau Elke Hornung und Herrn Mark Peric dafür Danke sagen, dass sie mir geholfen haben, diese Arbeit in eine lesbare äußere Form zu bringen.

9 Veröffentlichungen

Originalarbeiten

1. Krug A, **Towarowski A**, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM and Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40L to induce high amounts of IL-12
Eur. J. Immunol. 2001. **31**: 3026-3037; JIF 5,4
2. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, **Towarowski A**, Krieg AM, Endres S and Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human $\gamma\delta$ T cells via interferon- α / β
Eur. J. Immunol. 2001. **31**: 3525-3534; JIF 5,4
3. Wollenberg A, Wagner M, Gunther S, **Towarowski A**, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases.
J Invest Dermatol. 2002 Nov;119(5):1096-102; JIF 5,4
4. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, **Towarowski A**, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells.
J Immunol. 2003 May 1;170(9):4465-74; JIF 7,3
5. Rothenfusser S, Hornung V, Ayyoub M, Britsch S, **Towarowski A**, Krug A, Lubenow N, Endres S, Speiser D and Hartmann G. Two distinct types of CpG oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8 T cell responses in vivo
Blood. 2004; 103: 2162-2169; JIF 10,1

Abstracts

1. **Towarowski A**, Krug A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM and Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40L to induce high amounts of IL-12
Biological Therapy of Cancer, München (2001)
2. **Towarowski A**, Krug A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM and Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40L to induce high amounts of IL-12
2nd International Symposium: Activating Immunity with CpG Oligos, Amelia Island (2001)
3. Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, **Towarowski A**, Endres S and Hartmann G. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human $\gamma\delta$ T cells via Interferon- α/β
2nd International Symposium: Activating Immunity with CpG Oligos, Amelia Island (2001)
4. **Towarowski A**, Kerkmann M, Krug A, Hornung V, Britsch S, Rothenfusser S, Endres S, and Hartmann G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40L to induce high amounts of IL-12
32nd Annual Meeting of the German Society of Immunology in Dresden (2001)

10 Lebenslauf

Andreas Hyazinth Towarowski

geboren am 15. Juni 1976 in Breslau, Polen

Eltern Dr. rer. nat. Eva Towarowski (Diplom-Chemikerin)
 Dr. rer. nat. Stanislaus Towarowski (Diplom-Chemiker) †

Schulische Ausbildung

1982 – 1984 Volksschule München (Grundschule Stielerstraße 6), München
1984 – 1986 Grundschule Mitte, Eichenau
1986 – 1995 Graf-Rasso-Gymnasium, Fürstenfeldbruck
06/1995 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,5)

Zivildienst

1996 – 1997 Nachbarschaftshilfe Eichenau e.V., Eichenau

Studium

10/1995 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
08/1998 Ärztliche Vorprüfung (Note: 2)
08/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 3)
1999 – 2000 Co-Assistent im Kursus für makroskopische Anatomie an der Anatomischen Anstalt der LMU München
08/2000 Dissertation bei Herrn Prof. Dr. S. Endres, Abteilung für Klinische Pharmakologie, Medizinische Klinik Innenstadt, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
03/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,67)
2003 – 2004 Praktisches Jahr
 Neurologie an der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
 Chirurgie am Nepean Hospital, Sydney University, Australien und Chirurgie an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Großhadern, Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität, München
 Innere Medizin am städtischen Krankenhaus München-Schwabing, München
04/2004 Ärztliche Prüfung (Geamtnote: 2)

05/2004 Vorläufige Berufserlaubnis als Arzt im Praktikum
10/2004 Ärztliche Vollapprobation
10/2004 Aufnahme des Masterstudiums der Medizintechnik an der Technischen
Universität München

Beruf

04 – 09/2005 Field Based Monitor bei der Janssen-Cilag GmbH (Neuss)
seit 10/2005 Clinical Research Associate (selbständig)